

表皮のバリア機能に対するスフィンゴミエリンの 役割の解明

板谷 友里奈

目次

略語表	4
緒言	5
第 1 章 SM の 3 次元培養皮膚中脂質量におよぼす影響とその機構解明	
第 1 節 緒言	9
第 2 節 方法	
2-1. 実験材料	11
2-2. スフィンゴミエリンリポソーム作製	11
2-3. スフィンゴミエリンリポソームから生成するセラミド種の検討	12
2-4. SM 投与後の培養時間による遺伝子発現量の検討	13
2-5. SM の濃度による遺伝子発現量の変化	13
2-6. RNA 抽出	13
2-7. リアルタイム PCR	14
2-8. β -グルコセレブロシダーゼ阻害剤含有培地の調製	15
2-9. LabCyte EpiModel の培養とスフィンゴミエリンリポソーム適用	15
2-10. 脂質抽出	16
2-11. セラミド、グルコシルセラミドおよび SM 定量	16
2-12. 統計解析	17
第 3 節 結果	
3-1. スフィンゴミエリンリポソームから生成するセラミド種の検討	18
3-2. SM 適用後のセラミド代謝関連酵素の遺伝子発現量の経時変化	19
3-3. 遺伝子発現量に及ぼす SM 濃度の影響	20
3-4. β -グルコセレブロシダーゼ阻害剤と SM の併用による皮膚中脂質量	21
第 4 節 考察	24
第 2 章 スフィンゴミエリン合成酵素 2 ノックアウトマウス皮膚表現型 の基礎的検討	

第 1 節 緒論	28
第 2 節 方法	
2-1. 使用動物	30
2-2. 実験材料	30
2-3. SMS2KO マウスの遺伝子検査	30
2-4. TEWL 測定	32
2-5. 角層と表皮の採取	32
2-6. RNA 抽出	32
2-7. リアルタイム PCR	33
2-8. SMS2KO マウスへの UVB 照射と TEWL 測定および角層採取	34
2-9. SMS2KO マウスへの創作製と創面積の測定	34
2-10. SMS2KO マウスへの TS 処理と TEWL 測定	35
2-11. 脂質抽出	35
2-12. HPTLC による脂質定量	35
2-13. HE 染色による皮膚形態観察	36
2-14. 表皮厚測定	36
2-15. 統計解析	36
第 3 節 結果	
3-1. SMS2KO マウスの TEWL	38
3-2. SMS2KO マウスのセラミド代謝関連酵素の遺伝子発現量	39
3-3. SMS2KO マウスの表皮および角層中セラミド量	40
3-4. UVB 照射による SMS2KO マウスの TEWL の変動	42
3-5. UVB 照射による SMS2KO マウスの角層中セラミド量	43
3-6. SMS2KO マウスへの創作製および経時的な創治癒	44
3-7. SMS2KO マウスの TEWL に対する TS 処理の影響	45
3-8. HE 染色による SMS2KO マウスの皮膚形態観察および表皮厚	46
第 4 節 考察	47

第 3 章 スフィンゴミエリン合成酵素 1 ノックアウトマウス皮膚表現型の基礎的検討	
第 1 節 緒論.....	51
第 2 節 方法.....	
2-1. 使用動物	54
2-2. 実験材料	54
2-3. TEWL 測定.....	54
2-4. SMS1KO マウスの角層採取.....	54
2-5. 脂質抽出および HPTLC による脂質定量	54
2-6. SMS1KO マウスへの SM 腹腔内投与	55
第 3 節 結果.....	
3-1. SMS1KO マウスの TEWL	56
3-2. SMS1KO マウスの角層中セラミドおよびコレステロール量.....	57
3-3. SM 長期投与後の SMS1KO マウスの TEWL	58
3-4. SM 長期投与後の SMS1KO マウス角層中脂質量.....	59
3-5. SM 長期投与後の SMS1KO マウス表皮厚	60
第 4 節 考察.....	61
総括.....	63
謝辞.....	65
参考文献	66

略語表

CBE: conduritol B epoxide

CER: ceramide

β -GCase: β -glucocerebrosidase

GCS: glucosylceramide synthase

GlcCer: glucosylceramide

HE: hematoxylin-eosin

HPTLC: high performance thin-layer chromatography

PBS: phosphate buffered saline

PCR: polymerase chain reaction

SC: stratum corneum

SM: sphingomyelin

a-SMase: acid-sphingomyelinase

SMS: sphingomyelin synthase

SPT: serine-palmitoyl transferase

TEWL: transepidermal water loss

TS: tape stripping

WT: wild type

緒言

皮膚はバリア機能や水分保持機能を有し、生体の防御器官として働いている。皮膚は表皮と真皮から構成されており、その下に皮下組織を有する。表皮は皮膚表面から角層、顆粒層、有棘層、基底層に分かれている。そのなかでも角層は外界からの異物の侵入を防ぐバリア機能や、水分の蒸散を防ぐ水分保持機能に重要な役割を果たしている^{1,2)}。角層は、表皮細胞が分化することで扁平化した角質細胞と、その隙間を埋める細胞間脂質により構成されている。細胞間脂質の主成分はセラミド、コレステロール、脂肪酸、コレステロールエステルである。角層中で細胞間脂質が親水基、疎水基を同方向に向けた構造（ラメラ構造）を形成することでバリア機能を発揮する。特に、細胞間脂質成分の中でセラミドは含有量が約 40-50%と多く、角層バリア機能に最も重要な働きをする²⁻⁴⁾。

セラミドは表皮細胞の分化に伴って生成される (Fig. 1)。セラミドの生成はセリンとパルミトイル CoA を出発物質とし、表皮基底細胞内のセリンパルミトイルトランスフェラーゼ (serine-palmitoyl transferase: SPT) により 3-ケトスフィンガニンを生合成する反応から始まる。SPT は、スフィンゴ脂質合成における律速酵素である。この 3-ケトスフィンガニンは様々な酵素による反応を経てセラミドとなる。このセラミドはゴルジ体において、スフィンゴミエリン合成酵素 (sphingomyelin synthase: SMS) もしくはグルコシルセラミド合成酵素 (glucosylceramide synthase: GCS) によりスフィンゴミエリン (sphingomyelin: SM) やグルコシルセラミドに変換され、顆粒層の層板顆粒に蓄積される⁵⁾。また、層板顆粒は顆粒細胞が角質細胞へ分化する際に細胞間へと分泌される。この時、層板顆粒中の SM やグルコシルセラミドは必要に応じて層板顆粒に存在するスフィンゴミエリナーゼ (sphingomyelinase: SMase) や β -グルコセレブロシダーゼ (β -glucoserebrosidase: β -GCCase) により加水分解されてセラミ

ドとなる⁵⁻¹⁰⁾。最終的にセラミドはセラミダーゼにより脂肪酸とスフィンゴシンに分解される。

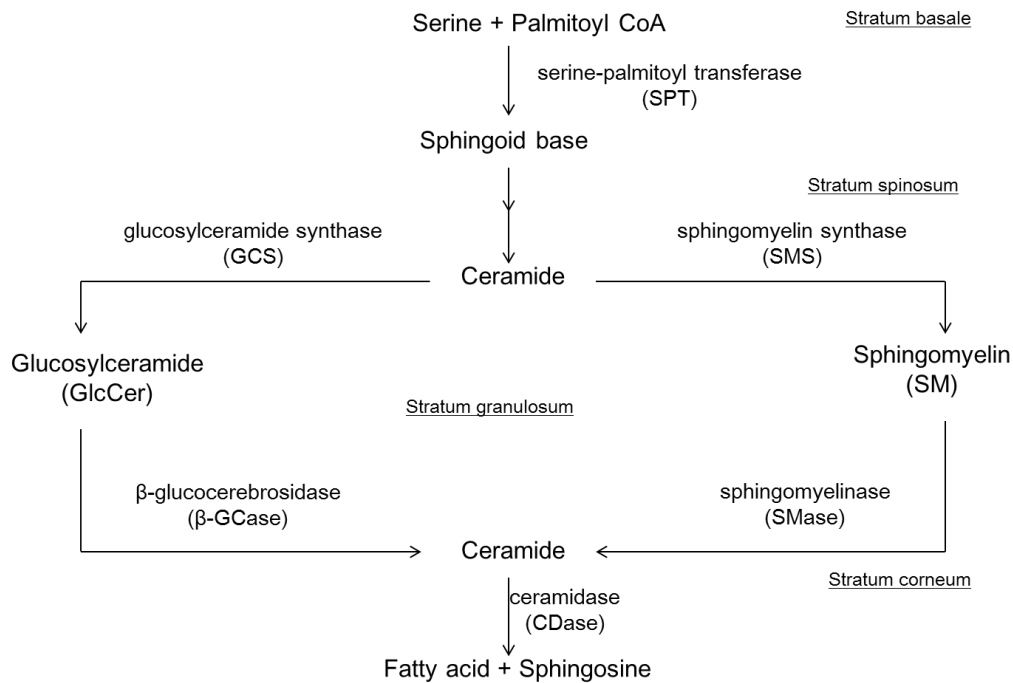
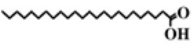
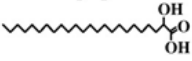
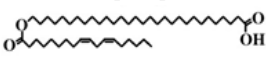
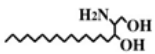
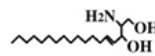
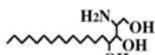
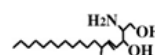


Fig. 1 Metabolism of ceramide in skin

セラミドは、スフィンゴイド塩基のアミノ基に脂肪酸がアミド結合した構造をしており、脂肪酸とスフィンゴイド塩基の組合せにより複数のタイプが存在する^{10,11)} (Table 1)。一般的に、SMからはセラミド [non-hydroxy fatty acid, sphingosine: NS]とセラミド [α-hydroxy fatty acid, sphingosine: AS]が生成され则认为られている⁷⁾。また、グルコシルセラミドからは全てのセラミド種が生成され则认为られている⁸⁾。

Table 1 Structure and Nomenclature of Ceramides in Human Stratum Corneum ¹¹⁾

<div>Fatty acid</div> <div>Sphingoid</div>	<div>Non-hydroxy fatty acid [N]</div> 	<div>α-hydroxy fatty acid [A]</div> 	<div>Esterified ω-hydroxy fatty acid [EO]</div> 
<div>Dihydrosphingosine [DS]</div> 	CER [NDS] (CER 10)	CER [ADS] (CER 11)	CER [EODS] (CER 12)
<div>Sphingosine [S]</div> 	CER [NS] (CER 2)	CER [AS] (CER 5)	CER [EOS] (CER 1)
<div>Phytosphingosine [P]</div> 	CER [NP] (CER 3)	CER [AP] (CER 6)	CER [EOP] (CER 9)
<div>6-hydroxy sphingosine [H]</div> 	CER [NH] (CER 8)	CER [AH] (CER 7)	CER [EOH] (CER 4)

前述の通り、セラミドは皮膚のバリア機能に重要であり、その量を適正化することは皮膚バリア機能の改善に繋がることが考えられる。すでに、徳留らはセラミドの前駆体である **SM** やグルコシルセラミドに着目し、その有用性を評価しており、これまでに、**SM** を皮膚に塗布することで皮膚中セラミド量が増加することを明らかにしてきた。一方で、正常皮膚に **SM** を塗布しても皮膚中セラミド量は増加しない (データ図示せず) ことも明らかにしてきた。この結果から、皮膚中セラミド量の制御には内因性 **SM** が重要である可能性が高いと考えられる。しかし、外因的 **SM** 適用の皮膚中セラミド量の増加に対する機構や、内因性 **SM** の皮膚における役割の詳細についてはまだ十分解明されていない。

そこで、本研究ではセラミド前駆体の 1 つである **SM** の表皮における

役割に着目した。第 1 章では、**SM** の皮膚中脂質量に対する影響を 3 次元培養ヒト表皮モデルを用いて検討した。また、第 2 章では、**SM** の皮膚における機能解明のため、**SM** を生成する酵素であるスフィンゴミエリン合成酵素 2 のノックアウトマウスを用い、皮膚での表現型についての基礎的検討を行った。さらに、第 3 章では、スフィンゴミエリン合成酵素 1 のノックアウトマウスを用いて皮膚表現型の検討を行った。加えて、**SM** の腹腔内投与によるスフィンゴミエリン合成酵素 1 ノックアウトマウスの皮膚状態についても評価した。以下、得られた結果を報告する。

第 1 章

SM の 3 次元培養皮膚中脂質量におよぼす影響とその機構解明

第 1 節 緒論

セラミドは細胞間脂質の中で最も含有量が多く、皮膚バリア機能の維持に重要である²⁻⁴⁾。皮膚中セラミド量の減少と皮膚疾患には深い関わりがあり、たとえば、アトピー性皮膚炎患者の皮膚では、角層の水分保持機能やバリア機能の低下が知られている。これは、セラミドの前駆体である SM がスフィンゴミエリンデアシラーゼによりスフィンゴシルフォスフォコリンに、グルコシルセラミドはグルコシルセラミドデアシラーゼによってグルコシルスフィンゴシンに分解されることで、セラミド生成量が減少することや、セラミド自体が減少するためであると考えられている^{4,9,12-15)}。また、老人性乾皮症では、皮膚中のセラミド量が減少し、乾燥性が増大する¹⁶⁾。これは、セラミドを分解するセラミダーゼの活性の増大が原因であると考えられている¹⁷⁾。さらに、SMase の欠損症であるニーマンピック病¹⁸⁾ や β -GCase 欠損症であるゴーシュ病¹⁹⁾ では、SM やグルコシルセラミドの蓄積と共に、セラミドの生成量が減少することで水分保持機能やバリア機能が低下する。これらのことから、皮膚中のセラミド量を増加させることにより、皮膚疾患の改善が期待できる。しかし、セラミドは高価であり、疎水性が高いことなどから、皮膚への直接的な適用や製剤化は困難である。徳留らはセラミドの前駆体である SM やグルコシルセラミドに着目し、これらのリポソーム化体を使用することで皮膚中セラミド量の増加を目的とする研究を行ってきた²⁰⁻²²⁾。リポソームは、リン脂質を水溶液中に懸濁することで得られる脂質 2 重層構造を持つ閉鎖小胞である。脂溶性の物質をリポソーム膜内に、また、水溶性物質を内水相に保持することができるため、リポソームは薬物の徐放、薬物の標的組織への送達、代謝酵素からの保護や毒性の軽減など、薬物キャリアーとして用いられている。

徳留らは **SM** やグルコシルセラミドなどの脂質を水溶性懸濁液として適用できること、リポソームの粒子径や電位などをはじめとする物性や、構成脂質の組成を変化させることが可能であること、薬物の封入などにより薬物キャリアーとして用いることができることなどの利点からリポソームを研究に用いている。徳留らはこれまでに、3次元培養ヒト表皮モデルには **SMase** 活性や β -GCase 活性が認められることを報告した^{20,21)}。さらに、3次元培養ヒト表皮モデルにスフィンゴミエリンリポソームを適用することにより、皮膚中のセラミド[NS]、[non-hydroxy fatty acid, phytosphingosine: NP]、[AS]および[α -hydroxy fatty acid, phytosphingosine: AP]が増加すること²²⁾、3次元培養ヒト表皮モデルにグルコシルセラミドリポソームを適用することにより、セラミド[AS]が増加することを報告した²¹⁾。しかし、一般的には **SM** からはセラミド[NS]もしくはセラミド[AS]が生成され则认为られており、スフィンゴミエリンリポソーム適用によりセラミド[NS]、[AS]のみならず、セラミド[NP]、[AP]も増加した理由は不明である。

そこで本章では、これまでの報告を基に、セラミド代謝関連酵素の遺伝子発現量に着目し、3次元培養ヒト表皮モデルを用いて、セラミド代謝に対する **SM** の影響を検討した。

第2節 方法

2-1. 実験材料

3次元培養ヒト表皮モデルである LabCyte EPI-MODEL とアッセイ培地は、株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング（蒲郡，愛知，日本）より購入した。SM (Sphingomyelin M) は、日油株式会社（東京，日本）から購入した。*Bacillus cereus* 由来 SMase は、Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, U.S.A.) から購入した。セラミド[NS]、およびセラミド[AS] は、Matreya (Pleasant Gap, PA, U.S.A.) から購入した。セラミド[NP]およびセラミド[AP]は、Evonik (Rellinghauser, Essen, Germany) から得た。L-アスコルビン酸リン酸エステルマグネシウム塩 n 水和物、クロロホルム、イソプロピルアルコール、エタノール、メタノール、酢酸、アセトン、ヘキサン、ジエチルエーテルは、和光純薬工業株式会社（大阪，日本）から購入した。グルコシルセラミド標準品は、株式会社岡安商店（越谷，埼玉，日本）より供与された。Phosphate buffered saline (PBS)、RNAiso Plus、PrimeScript® RT reagent Kit、SYBR® Premix Ex Taq™ は、タカラバイオ株式会社（大津，滋賀，日本）より購入した。Conduritol B epoxide (CBE) は、Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Delaware, CA, U.S.A.) より購入した。

2-2. スフィンゴミエリンリポソーム作製

スフィンゴミエリンリポソームは、薄膜法と凍結融解法を組み合わせで作製した²³⁾。クロロホルムに溶解させた SM を 10 もしくは 30 mg/mL となるようにナス型フラスコに添加し、クロロホルムを適量加えた。ロータリーエバポレータ (Rotavapor R-210, Vacuum Pump V-700, Vacuum Controller V-850, Heating Bath B-491) (Buchi, Meierseggstrasse, Flawil, Switzerland) を用いて溶媒を除去し、ナス型フラスコ内に脂質の薄膜を作製した。その後、デシケータで減圧し、溶媒を完全に除去した。ナス型フラスコに PBS を加え、相転移温度以上で加温しながら Vortex Genie

2 (Scientific Industries, Bohemia, NY, U.S.A.) で機械的振動を与えて脂質薄膜を水和し、多重膜のリポソームを得た。次に、液体窒素を用いて凍結融解を 5 回行い、多重膜リポソームを 1 枚膜リポソームにした。得られたリポソームをエクストルーダ (Extruder, Lipix Vancouver, Northern Lipids Inc., Burnaby, BC, Canada) を用いて、相転移温度以上でリポソームを窒素ガスにより押し出し、pore size 400 nm, 200 nm のポリカーボネート膜 (Nuclepore, Whatman) を 3 回通し、その後 100 nm のポリカーボネート膜を 5 回通すことで、粒子径が均一なリポソームを得た。その後、リポソームを超遠心機 (himac CS120GXII, 日立製作所, 東京, 日本) を用いて、4°C、235,000 × g の条件で 15 分間遠心分離した。遠心分離後、上清を取り除き、沈殿に PBS を加えて再分散を行った。再分散して得られたリポソームを実験に用いた。

2-3. スフィンゴミエリンリポソームから生成するセラミド種の検証

マイクロチューブに、作製した 10 mg/mL のスフィンゴミエリンリポソーム 1 mL を入れ、1 U *Bacillus cereus* 由来スフィンゴミエリナーゼを 1 µL 添加し、37°C で 24 時間インキュベートした。また、コントロールとしてスフィンゴミエリンリポソームのみをマイクロチューブに入れ、同条件でインキュベートした。その後、HPTLC プレート (HPTLC Silica gel 60, Merck, Frankfurt, Darmstadt, Germany) にガラス毛细管 (ringcaps, hirschman laborgerate, Eberstadt, Postfach, Germany) を用いてサンプルを 10 µL スポットした。また、セラミド標準品としてセラミド[NS]、セラミド[NP]、セラミド[AS]、セラミド[AP]を同量スポットした。展開溶媒にクロロホルム : メタノール : 酢酸 (190 : 9 : 1) を用い、HPTLC プレートの上端から 1 cm まで展開し、プレートを乾燥後、再度展開した。展開後、プレートに 10% 硫酸銅含有 8% リン酸水溶液を噴霧し、TLC plate heater III (Camag, Muttenz, Switzerland) を使用して 180°C で 10 分間加熱

した。これをルミノイメージアナライザーシステム (LAS-1000 plus, 富士フィルム株式会社, 東京, 日本) により画像化し、生成したセラミド種を確認した。

2-4. SM 投与後の培養時間による遺伝子発現量の検討

SM 投与後の培養時間によるセラミド代謝関連酵素の遺伝子発現量の変動を検討するため、LabCyte EPI-MODEL (6 日間エアリフト品, 12 well) の角層側から、調製した 10 mg/mL のスフィンゴミエリンリポソームを 200 μ L、コントロールとして PBS を同容量適用し、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。サンプル適用 4 時間後、8 時間後、24 時間後に表皮を回収し、RNA の抽出を行った。

2-5. SM の濃度による遺伝子発現量の変化

SM 濃度によるセラミド代謝関連酵素の遺伝子発現量の変動を検討した。LabCyte EPI-MODEL (6 日間エアリフト品, 12 well) の角層側から、調製した 10 および 30 mg/mL のスフィンゴミエリンリポソームを 200 μ L、コントロールとして PBS を同容量適用し、37°C、5% CO₂ 条件下で 24 時間培養した。その後、表皮を回収し、後述の方法で RNA の抽出を行った。

2-6. RNA 抽出

マイクロチューブ中に RNAiso Plus 1 mL を加え、培養カップからかき取った培養皮膚を入れ、激しく攪拌することで皮膚を溶解した。マイクロチューブにクロロホルム 200 μ L を加え、激しく攪拌し、4°C、12,000 \times g で 15 分間遠心分離した。遠心後の上層を、200 μ L のクロロホルムを入れた新しいマイクロチューブに回収し、激しく攪拌した後、再び 4°C、

12,000 × g で 15 分間遠心分離した。遠心分離後の上層を、500 μL の冷えたイソプロパノールを入れた新しいマイクロチューブに回収し、一晚 -30°C で保存した。その後、マイクロチューブを 4°C、12,000 × g で 10 分間遠心分離し、RNA を沈殿させた。上層を取り除き、RNA 沈殿物に冷えた 70%エタノール (500 μL) を加えて 4°C、12,000 × g で 15 分間遠心分離し、RNA の洗浄を行った。この操作は 2 回行った。2 回目の上層除去後、RNA 沈殿物を風乾した。RNA 沈殿物に 7 μL の RNase free 水を加えて沈殿物を溶解させ、氷上で 15 分間静置した。RNA 溶液を 1 μL 取り、RNase free 水で 100 倍希釈し、マイクロプレートリーダー (SpectraMax M2^e, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, U.S.A.) を用いて、260 nm および 280 nm での吸光度を測定し、総 RNA 量を算出した。RNA の純度は OD₂₆₀/OD₂₈₀ により確認した。遠心分離にはテーブルトップマイクロ冷却遠心機 3500 (久保田商事株式会社, 東京, 日本) を使用した。

2-7. リアルタイム PCR

抽出した RNA は PrimeScript® RT reagent Kit を用いて逆転写した。1 サンプルあたり 5 × PrimeScript Buffer (2 μL)、PrimeScript RT Enzyme Mix (0.5 μL)、Oligo dT Primer (0.5 μL)、Random 6-mers (0.5 μL) を混合し、8 連チューブに 3.5 μL ずつ分注した。RNase free 水に溶解させた RNA を、1 チューブあたり 0.5 μg となるように加えた後、RNase free 水を加えて合計 6.5 μL とした。チューブを軽く攪拌し、サーマルサイクラー (Veriti™ 96 well Thermal Cycler, Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.) により逆転写反応を行った。

逆転写反応後、SYBR® *Premix Ex Taq*TM を用いてリアルタイム PCR を行った。SYBR® *Premix Ex Taq* 10 μL、10 μM PCR Forward Primer 0.4 μL、10 μM PCR Reverse Primer 0.4 μL、ROX Reference Dye I 0.4 μL、滅菌精

製水 6.8 μL を混合して 8 連チューブに 18 μL ずつ分注し、各 cDNA 2 μL を加え、合計 20 μL とした。軽く攪拌後、Step One PlusTM Real- Time PCR System (Applied Biosystems) により、リアルタイム PCR を行った。遺伝子発現量の評価は、スタンダード法を用いて PBS を適用したコントロールの遺伝子発現量を 1 として相対定量した。検討したセラミド代謝関連酵素として、SPT-1、2、a-SMase、 β -GCcase を選択した。以下に各酵素のプライマー配列を示す (Table 2)。

Table 2 Primer Sequence

Primer		Sequence
GAPDH	Forward	5' -GAAGGTGAAGGTCGGAGT- 3'
	Reverse	5' -GAAGATGGTGATGGGATTTC- 3'
SPT-1	Forward	5' -TGTTCCACCGTGACCACAAC- 3'
	Reverse	5' -GCGCGCTACTTGGAGAAAGA- 3'
SPT-2	Forward	5' -CCTGCTCTTGTTGGCAAAGG- 3'
	Reverse	5' -GCTCCCAGAACCAGTGATGC- 3'
β -GCcase	Forward	5' -GCTAGGCTCCTGGGATCGAG- 3'
	Reverse	5' -GTTCAGGGCAAGGTTCCAGTC- 3'
a-SMase	Forward	5' -ACTTTGATAACTGCTCCTCTGAC- 3'
	Reverse	5' -TTCGTGTCCAGCAGAGTACC- 3'

2-8. β -グルコセレブロシダーゼ阻害剤含有培地の調製

LabCyte EPI-MODEL のアッセイ培地に、 β -GCcase 阻害剤である CBE²⁴⁾ を最終濃度が 1 mM となるように添加した。コントロールには CBE 未添加の培地を使用した。

2-9. LabCyte EPI-MODEL 培養とスフィンゴミエリンリポソーム適用

LabCyte EPI-MODEL (6 日間エアリフト品, 12 well) の角層側から、調製した 10 mg/mL のスフィンゴミエリンリポソームを 200 μ L、コントロールとして PBS を 200 μ L 適用し、37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。培養期間中は毎日または 1 日おきに培地交換を行い、サンプルは 1 日おきに交換した。7 日後、アスコルビン酸 (25 μ g/mL) を添加した分化誘導培地に変え、1 日培養した。

2-10. 脂質抽出

培養を終えた LabCyte EPI-MODEL を、培養カップのメンブランフィルターごとメスを用いて切り取り、クロロホルム : メタノール (2 : 1) 中で、ハサミを用いて細断した。その後、培養皮膚をプローブ型超音波発生装置 (ADVANCED SONIFIER MODEL 250A, BRANSON, Danbury, CT, U.S.A.) を用いて 50 W、10 分の条件で脂質を抽出した。抽出後、フィルタ (Millex Gn 0.20 μ m, Millipore, Billerica, MA, U.S.A.) を用いてろ過し、ろ液をドライブロックバス (dry thermo unit DTU-1C, Taitec, 越谷, 埼玉, 日本) を用いて乾固した。その後、クロロホルム : メタノール (2 : 1) を 100 μ L 加えて再溶解し、これを脂質サンプルとした。

2-11. セラミド、グルコシルセラミドおよびスフィンゴミエリン定量

HPTLC プレートに調製した脂質サンプルを ringcaps で 10 μ L ずつスポットした。また、セラミド標準品としてセラミド[NS]、セラミド[NP]、セラミド[AS]、セラミド[AP]を同量スポットした。スポットした標準品の濃度は 0.01、0.025、0.1、0.5、1.0 mg/mL とした。スポット後、各脂質を下表の展開溶媒を用いて 2 回展開した (Table 3)。展開後、プレートに 10% 硫酸銅含有 8% リン酸水溶液を噴霧し、TLC plate heater III を使用

して 180°C で 10 分間加熱した。これをルミノイメージアナライザーシステムにより画像化し、Multi Gauge V3.0（富士フイルム株式会社）を用いて密度からセラミド量を算出した。

Table 3 Composition of Developing Solvent for HPTLC

	Developing solvent	Composition (v/v)	Ref.
Ceramide	Chloroform : Methanol : Acetic acid	190 : 9 : 1	24
Glucosylceramide	Chloroform : Methanol : Acetone	76 : 20 : 4	24
Sphingomyelin	Chloroform : Methanol : Water	12 : 6 : 1	25
	Hexane : Diethyl ether : Acetic acid	16 : 4 : 3	

2-12. 統計解析

SAS 統計解析システム ver. 9.2 (SAS Institute、Cary, NC, U.S.A.) を使用し、 p 値を算出した。統計解析法には、Dunnett または Tukey の多重検定を用いた。

第3節 結果

3-1. スフィンゴミエリンリポソームから生成するセラミド種の検証

10 mg/mL スフィンゴミエリンリポソームと 1 U *Bacillus cereus* 由来 SMase の反応物を 37°C で 24 時間インキュベートし、生成するセラミド種を HPTLC により確認した。その結果、スフィンゴミエリンリポソームと *Bacillus cereus* 由来 SMase を反応させることでセラミド[NS]の生成が確認された。しかし、[NS]以外のセラミド種は確認されなかった (Fig. 2 (2))。一方、スフィンゴミエリンリポソーム群には、セラミドは含有されないことが明らかとなった (Fig. 2 (1))。

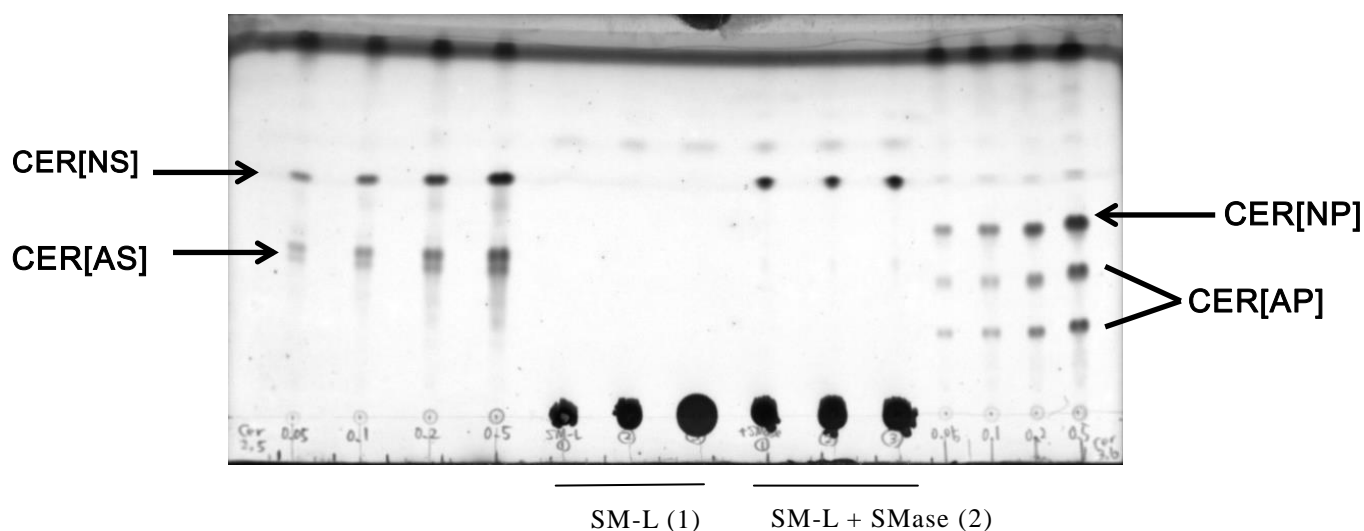


Fig. 2 The HPTLC Pattern of SM-L (1) and SM-L + SMase Mixtures (2)

3-2. SM 適用後のセラミド代謝関連酵素の遺伝子発現量の経時変化

LabCyte EPI-MODEL の角層側から、調製した 10 mg/mL スフィンゴミエリンリポソームを適用し、4、8、24 時間後のセラミド代謝関連酵素の遺伝子発現量をリアルタイム PCR により測定した。その結果、スフィンゴミエリンリポソーム適用 4、8、24 時間後において SPT-1 遺伝子発現量はコントロールの 1.03、0.93、0.72 倍と、経時的に減少し (Fig. 3a,b)、また、SPT-2 遺伝子発現量は 1.02、1.06、0.57 倍と、減少した。一方、a-SMase 遺伝子発現量は 0.73、0.88、1.32 倍と、経時的に増加した。さらに、 β -GCase 遺伝子発現量は 0.91、1.05、1.36 倍と、経時的に増加した (Fig. 3c, d)。

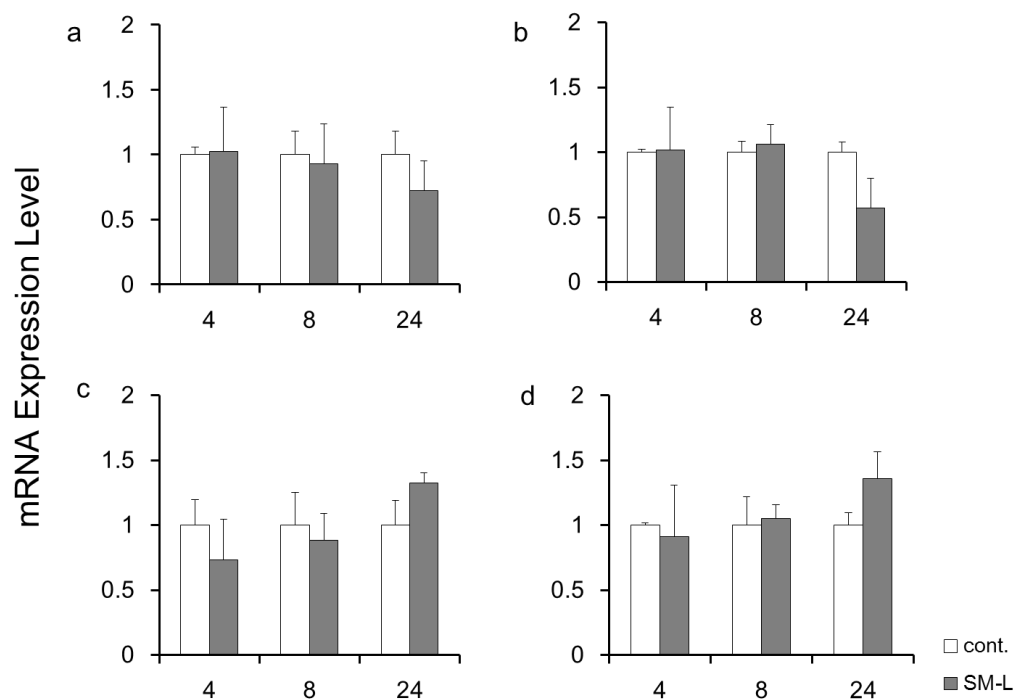


Fig. 3 mRNA expression levels of SPT-1 (a), SPT-2 (b), a-SMase (c) and β -GCase (d) 4, 8 and 24 h after application of 10 mg/mL SM-L to three dimensional cultured epidermis. mRNA expression was determined by quantitative real-time PCR. Values are the mean \pm S.D. of three experiments.

3-3. 遺伝子発現量に及ぼす SM 濃度の影響

LabCyte EPI-MODEL の角層側から、調製した 10 または 30 mg/mL スフィンゴミエリンリポソームを適用し、24 時間後のセラミド代謝関連酵素の遺伝子発現量をリアルタイム PCR により測定した。その結果、10 または 30 mg/mL スフィンゴミエリンリポソーム適用により、SPT-1 遺伝子発現量はコントロールの 0.74、0.67 倍と、経時的に減少し、SPT-2 遺伝子発現量は 0.73、0.79 倍に減少した (Fig. 4a, b)。一方、a-SMase 遺伝子発現量は 1.29、1.47 倍と、経時的に増加した。また、 β -GCase 遺伝子発現量は 1.10、1.36 倍と、経時的に増加した (Fig. 4c, d)。

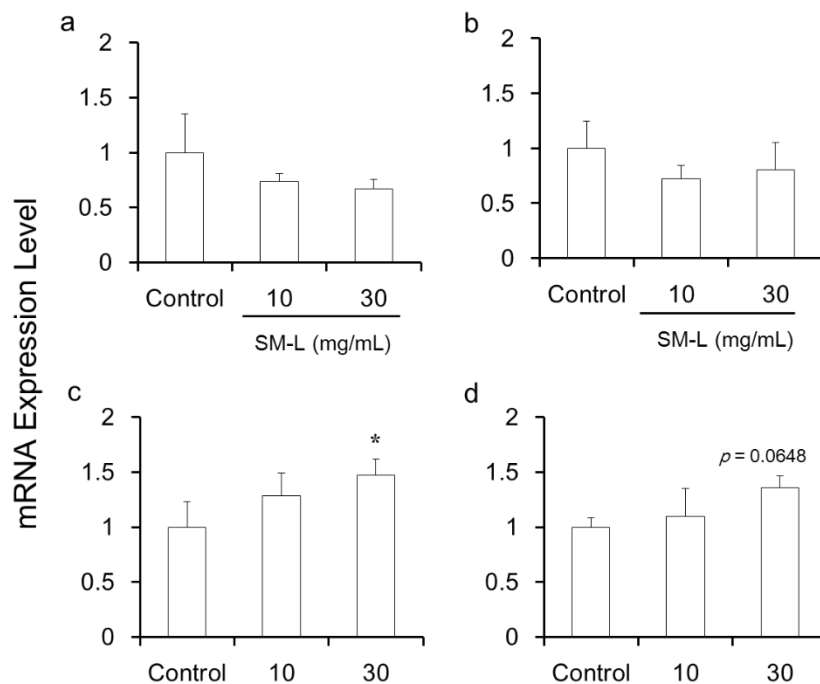


Fig. 4 mRNA expression levels of SPT-1 (a), SPT-2 (b), a-SMase (c) and β -GCase (d) 24 h after application of 10 and 30 mg/mL SM-L to three dimensional cultured epidermis. mRNA expression was determined by quantitative real-time PCR. Values are the mean \pm S.D. of three experiments.

* $p < 0.05$ versus control, Dunnet test.

3-4. β -グルコセレブロシダーゼ阻害剤と SM の併用による皮膚中脂質量

β -GCase 阻害剤である CBE とスフィンゴミエリンリポソームを併用して Labcyte EPI-MODEL の培養を行い、培養後の皮膚中セラミド、グルコシルセラミドおよび SM を定量した。コントロール、PBS + CBE、スフィンゴミエリンリポソーム + CBE 群のそれぞれの表皮中セラミド量は、セラミド[NS]が、70.9、23.5、46.2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、セラミド[NP]が 11.2、3.2、5.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、セラミド[AS]が 10.4、3.0、5.4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、セラミド[AP]が 22.6、14.8、20.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ であった。CBE 処理により、検討した全てのセラミド種においてセラミド量が減少した。しかし、スフィンゴミエリンリポソームとの併用により、セラミド[NS]のみが有意に増加した。また、その他のセラミド種に大きな増加はみられなかった (Fig. 5)。さらに、コントロール、PBS + CBE、スフィンゴミエリンリポソーム + CBE 群のそれぞれの表皮中グルコシルセラミド量は 109.8、183.0、197.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ であった。CBE 処理群において、皮膚中グルコシルセラミド量の有意な増加がみられた。コントロール、PBS + CBE、スフィンゴミエリンリポソーム + CBE 群のそれぞれの SM 量は 61.2、61.9、131.1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ であった。スフィンゴミエリンリポソームを適用した群において、表皮中 SM 量は有意に増加した (Fig. 6)。

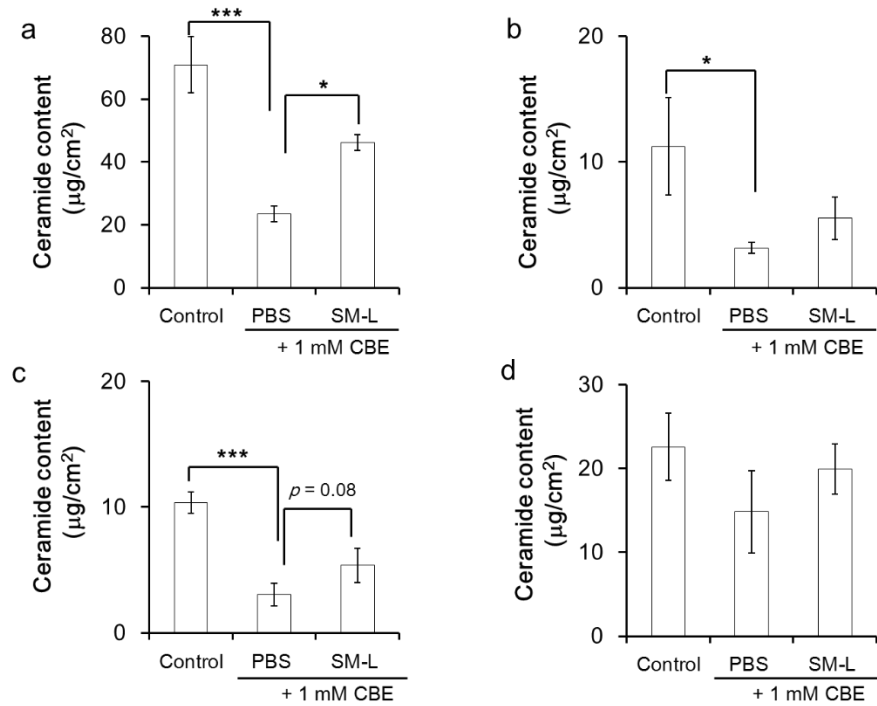


Fig. 5 Ceramide[NS] (a), [NP] (b), [AS] (c) and [AP] (d) contents in the three dimensional cultured epidermis after application of 10 mg/mL SM-L and treatment of 1 mM β -GCase inhibitor. SM-based liposomes were applied to the stratum corneum (SC) side for 7 days. Values are the mean \pm S.D. of three experiments. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, Tukey's test.

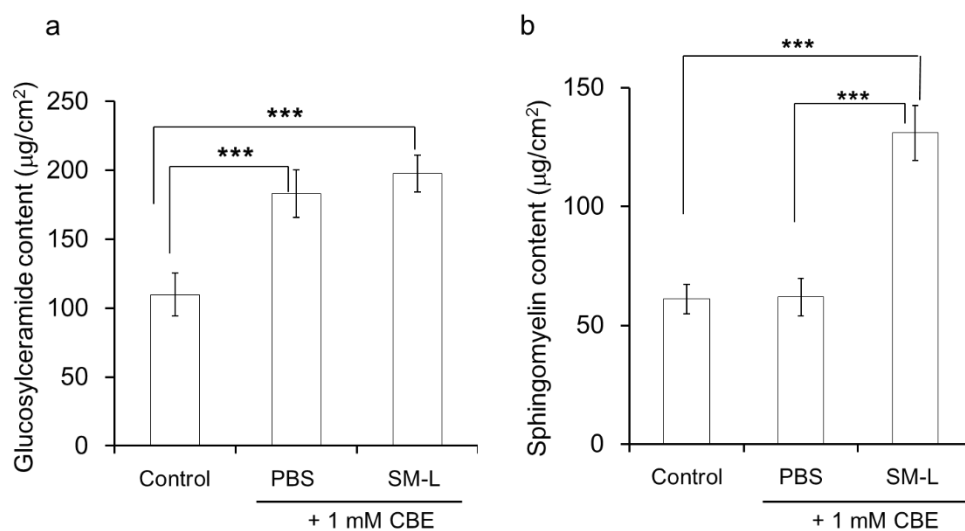


Fig. 6 Glucosylceramide (a) and sphingomyelin (b) contents in the three dimensional cultured epidermis after application of 10 mg/mL SM-L and treatment of 1 mM β -GCCase inhibitor. SM-based liposomes were applied to the stratum corneum (SC) side for 7 days. Values are the mean \pm S.D. of three experiments. *** $p < 0.001$, Tukey's test.

第4節 考察

本章では、3次元培養ヒト表皮モデル適用によるセラミド生成代謝に対する SM の影響についてセラミド代謝関連酵素の遺伝子発現量に着目し、検討した。

まず、本研究で使用するスフィンゴミエリンリポソームからどのセラミド種が生成されるのかを確認するために、作製したスフィンゴミエリンリポソームと *Bacillus cereus* 由来 SMase を反応させ、生成されるセラミド種を HPTLC により確認した。その結果、スフィンゴミエリンリポソームにはセラミドが含まれていないことが確認された。一方、スフィンゴミエリンリポソームと SMase の反応物からセラミド[NS]が生成されることが確認された。しかし、[NS]以外のセラミド種は確認されなかった (Fig. 2)。これらのことから、スフィンゴミエリンリポソームと SMase による反応ではセラミド[NS]のみが生成されることが示唆された。一般的に、ヒト角層中には 12 種類のセラミドが存在することが報告されており、それぞれはスフィンゴイド塩基と脂肪酸の組み合わせにより命名されている¹¹⁾。そのうち、SM からはセラミド[NS]と[AS]が、グルコシルセラミドからは全てのセラミド種が生成することが報告されている^{7,8)}。徳留らはスフィンゴミエリンリポソームの適用により皮膚中セラミド[NS]、[NP]、[AS]および[AP]が増加することを報告したが、上記の結果より、スフィンゴミエリンリポソーム適用によるセラミド[NS]以外の増加は、皮膚中 SMase 以外の因子が関与している可能性が考えられる。

次に、3次元培養ヒト表皮モデルである LabCyte EPI-MODEL に 10 mg/mL のスフィンゴミエリンリポソーム適用 4、8、24 時間後の経時的なセラミド代謝関連酵素の遺伝子発現量をリアルタイム PCR によって検討した。その結果、SPT-1 と SPT-2 遺伝子発現量は経時的な減少が認められた (Fig. 3)。一方、a-SMase 遺伝子発現量は経時的に増加した。また、 β -GCase 遺伝子発現量も経時的に増加した (Fig. 3)。これらのことから、

スフィンゴミエリンリポソームの適用により、皮膚中のセラミド代謝関連酵素の遺伝子発現が変動することが示された。セラミドはセリンとパルミトイル CoA を出発物質とし、律速酵素である SPT により 3-ケトスフィンガニンを生成する反応から生成される。その後、様々な代謝反応を経てセラミドの前駆体である SM やグルコシルセラミドに変換され、顆粒層の層板顆粒に蓄積される⁵⁾。層板顆粒中の SM やグルコシルセラミドは必要に応じて層板顆粒に存在する SMase や β -GCase により加水分解されてセラミドとなる⁵⁻¹⁰⁾。スフィンゴミエリンリポソームの適用により SPT 遺伝子発現量が経時的に減少し、SMase と β -GCase の遺伝子発現量が経時的に増加したことは、セラミドの増加によってネガティブフィードバックが起こり、SPT 遺伝子発現量が減少した可能性が考えられる。

次に、LabCyte EPI-MODEL に 10 もしくは 30 mg/ mL のスフィンゴミエリンリポソームを適用し、24 時間後のセラミド代謝関連酵素の遺伝子発現量をリアルタイム PCR によって検討した。適用時間は前述の実験で最も発現量が変動した 24 時間に固定した。10、30 mg/mL のスフィンゴミエリンリポソーム適用により、SPT-1 と SPT-2 遺伝子発現量は濃度依存的に減少した。また、SMase と β -GCase 遺伝子発現量は濃度依存的に増加した。皮膚、特に角層は外界からの異物侵入を防ぐバリアの役割を果たすため、化合物の浸透や透過は角層を透過することが重要である。一般的に、化合物の皮膚浸透は Fick の拡散式によって表現される。皮膚浸透と適用濃度には比例関係があるため、今回の結果から、角層側に適用したスフィンゴミエリンリポソームが皮膚内に浸透して効果を発揮した可能性がある。しかし、各濃度における皮膚に対する毒性の有無を確認する必要もある。

さらに、スフィンゴミエリンリポソームと β -GCase の競合阻害剤であ

る CBE を併用し、7 日培養後の培養皮膚中セラミド、グルコシルセラミドおよび SM 量を定量した。その結果、CBE 処理により、検討した全てのセラミド種は減少した。また、皮膚中グルコシルセラミド量は増加した。SM 量は CBE 処理によつては変動せず、スフィンゴミエリンリポソームを適用した群のみ増加した。これらのことから、CBE により β -GCCase が阻害され、グルコシルセラミドがセラミドに代謝されず、グルコシルセラミドが皮膚中に蓄積したことが考えられた。セラミドは、スフィンゴイド塩基と脂肪酸の組合わせにより複数の分子種が存在し、現在、ヒト角層中には 12 種類のセラミドが同定されている^{10,11)}。グルコシルセラミドはヒト角層中の全てのセラミド種の前駆体であると考えられているため、CBE 添加により今回検討した全てのセラミド種が減少したことが考えられる。一方、CBE とスフィンゴミエリンリポソームの併用により皮膚中のセラミド[NS]が増加した。しかし、他のセラミド種の大きな増加は認められなかった。これは、適用した SM がセラミド[NS]のみに代謝されたことが考えられ、上述の *Bacillus cereus* 由来スフィンゴミエリナーゼを用いた検討とも合致する。また、既に報告されているスフィンゴミエリンリポソームによるセラミド[NP]、[AS]および[AP]の生成は、内因性のグルコシルセラミドの増加によるものであることが示唆された。

本章では、スフィンゴミエリンリポソームの適用は皮膚中のセラミド代謝関連酵素の発現に影響を与え、SM やグルコシルセラミドの代謝に関与することで、皮膚中セラミドを増加させる可能性を示した。

SM は SMase による代謝を受けてセラミドを生成するだけでなく、グルコシルセラミドからセラミドを生成する経路にも影響を与える可能性を有し、本章において、外部より投与した SM が皮膚中のセラミド量の維持に重要な役割を果たすことが示唆された。今後、さらに詳細に SM の機能などを明らかにすることで、皮膚中のセラミド制御を目的とした

製剤への応用が期待できる。これは、アトピー性皮膚炎をはじめとする皮膚疾患の改善やスキンケアなどに応用できる可能性がある。

SM は従来、動物細胞膜の構成成分として知られており、皮膚においてはセラミド前駆体としてセラミド生成に関与することが知られていた。**SM** は **SMase** により加水分解を受けてセラミドを生成する一方、**SMS** によりセラミドとホスファチジルコリンから **SM** とジアシルグリセロールが生成される。近年、セラミドにはアポトーシスを始めとする様々な生理作用^{26, 27)} があることが発見され、さらに、ジアシルグリセロールには細胞増殖促進作用が報告されていることから、皮膚中における **SM** の機能や生理作用が注目されてきている。以下に示す第2章と第3章では、**SM** の皮膚における機能を詳細に調査することを目的とし、**SMS** のノックアウトマウスを用いた検討を行った。

第 2 章

スフィンゴミエリン合成酵素 2 ノックアウトマウス

皮膚表現型の基礎的検討

第 1 節 緒論

SMS はセラミドとホスホコリンから SM とジアシルグリセロールを生成する酵素である。SMS には SMS1、SMS2、SMSr の 3 種類のアイソザイムが存在する。SMS1、SMS2 は 6 つの膜貫通ドメインを有し、組織発現はヒトやマウスではユビキタスに発現していることが知られている²⁸⁾。SMS1 と SMS2 のヒトとマウス間における相同性は、SMS1 では 97.8%、SMS2 では 91.5% と、高い相同性がある²⁸⁾。また、細胞内局在は、SMS1 はゴルジ体、SMS2 はゴルジ体と形質膜である^{28,29)}。SMS1 および SMS2 は前述のようにセラミドとホスホコリンから SM とジアシルグリセロールを生成するが、SMSr には SM 合成能はなく、セラミドとホスファチジルエタノールアミンからセラミドホスホエタノールアミンを生成することが知られている³⁰⁾。

近年、セラミドから SM を合成する唯一の酵素である SMS が注目されてきている。すなわち、SMS が触媒する反応により、アポトーシス誘導脂質であるセラミドが消費され、細胞増殖性脂質であるジアシルグリセロールが産生されることから、SMS はこれらの脂質を介した細胞の増殖調節などに関与すると考えられる。現在、SMS 遺伝子のノックアウト (knockout: KO) マウスが作製され、SMS の機能解析を目的とした研究が進んでいる。これまでに、SMS1KO マウスでは、表現型として胎生致死、体重減少、血小板数減少、インスリン分泌低下³¹⁾、血漿や肝臓中での SM 減少³²⁾などが報告されている。また、SMS2KO マウスでは、血漿や脳中での SM 減少^{33,34)}、p 糖タンパク質の発現抑制や高脂肪食誘発性の脂肪肝減少³⁵⁾などの表現型が知られている。このように、種々臓器や組織に関する報告は多いが、SMSKO マウスの皮膚での表現型や、SMSKO マ

ウスを用いた皮膚中 **SMS** 機能解析については未だ報告されていない。

第 1 章において、体外から投与した **SM** が皮膚中セラミド量を増加させるメカニズムの一端を示し、体外から投与した **SM** は皮膚中のセラミド代謝に重要である可能性を示した。内因性の **SM** 変化が角層セラミドの代謝に影響しているかは明らかではないが、**SMSKO** マウスの皮膚中のセラミド量は野生型 (wildtype: **WT**) と異なることが考えられる。さらに、皮膚中の脂質量に異常があれば皮膚バリア機能についても **WT** と異なることが予想される。

第 2 章では、**SMS1KO** マウスと比較して作製や繁殖が容易である **SMS2KO** マウス皮膚表現型を明らかにするための基礎的検討を行った。はじめに、皮膚中セラミド量や皮膚バリア機能の指標である経表皮水分損失量 (transepidermal water loss: **TEWL**) を測定した。また、**SMS2KO** マウスの皮膚中セラミド代謝関連酵素の遺伝子発現量を **WT** と比較検討した。さらに、種々の方法で皮膚のバリア能を破壊し、その際の **TEWL** を測定し、バリア機能を比較した。

第 2 節 方法

2-1. 使用動物

C57BL/6 を遺伝的背景とし、相同組替えによって作製された SMS2KO マウスを用いた。SMS2KO マウスは山下 匡 教授 (麻布大学 獣医学部) より供与された。供与されたマウスを本学で飼育・繁殖させ、使用した。飼育は 12 時間ごとの明暗サイクル環境下で、温度と湿度が管理された部屋で行った。試料や水は自由摂取とした。動物の飼育、実験は城西大学動物実験管理委員会および城西大学組替え DNA 実験安全委員会の承諾を得て「城西大学動物実験規定」に従って行った。また、P1A レベルの拡散防止措置を講じた。実験に用いたマウスは全て雄性とした。

2-2. 実験材料

アガロースゲルはナカライテスク株式会社 (中京区, 京都, 日本) から購入した。ペントバルビタール (ソムノペンチル®) は共立製薬株式会社 (東京, 日本) から購入した。ヘキサン、エタノール、N,N-ジメチルホルムアミド (NN-DMF)、塩化ナトリウム、水酸化ナトリウム、EDTA-2Na、トリス塩基、マイヤーヘマトキシリン溶液、エオシン Y、キシレン、10% ホルマリン溶液および塩酸は和光純薬工業株式会社 (大阪, 日本) から購入した。その他の試薬は第 1 章と同様のものを使用した。

2-3. SMS2KO マウスの遺伝子検査

PCR 法により、SMS2KO マウスの遺伝子検査を行った。SMS2KO マウスの尾を先端から 1-2 mm 程度採取し、75 μ L の 0.2 mM EDTA-2Na 含有 25 mM NaOH 中に入れ、98°C で 1 時間加温した。加温後、同量の Tris-HCl (pH 5.3) を加えて攪拌し、1,000 \times g、4°C、10 分の条件で遠心分離した。上清を回収し、鋳型 DNA サンプルとした。サンプルは使用するまで凍結保存した。その後、Prime STAR® Max DNA Polymerase (タカラバイオ

株式会社、草津、滋賀、日本) を用いて PCR を行った。1 サンプルあたり、Prime STAR® Max DNA Polymerase (12.5 μ L)、forward および reverse 10 μ M プライマーを各 1.25 μ L、オートクレーブ水 (5.5 μ L)、鋳型 DNA 4.5 μ L を 8 連チューブに入れて混合し、合計 25 μ L とした。サーマルサイクラー (Veriti™ 96 well Thermal Cycler, Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.) を用いて PCR を行った。プライマー配列は Table 4 に示す。

Table 4 Primer Sequence

Primer		Sequence
GOR1SApcr1	Common	5'-AGCCACCGTGTCTGCGTTTGTTC-3'
GOR1-R1	For WT	5'-CCAAGTGCCTTCAAGTTTTGCTGTCTC-3'
NLSlacZ-R1	For KO	5'-CTCTTCTTTTTTGCGGAATTGCGGAACAC-3'

PCR 後の反応液 10 μ L と 6 \times Loading Buffer (タカラバイオ株式会社) 2.0 μ L を混合し、その 10 μ L を 1 μ g/mL ethidium bromide 含有 1.5% アガロースゲルにアプライし、電気泳動した。泳動後、トランスイルミネータによりバンドの確認を行った (Fig. 7)。

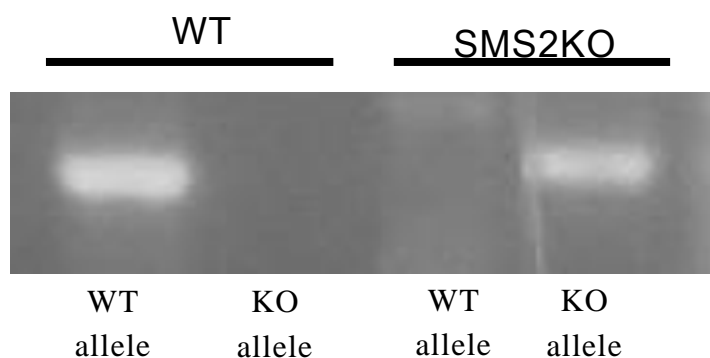


Fig. 7 Confirmation of SMS2 genotype.

2-4. TEWL 測定

全ての実験はマウスの毛を抜毛して行った。ペントバルビタールをマウスの腹腔内に投与し、麻酔した。麻酔下にてマウスの背部の毛を抜毛した。抜毛後、シェーバーにより細かい毛を取り除いた。抜毛の次の日に VAPO SCAN (VAPO SCAN AS-VT100RS, 株式会社アサヒテクノラボ, 横浜, 神奈川, 日本) により TEWL を測定した。尚、測定も麻酔下で行った。

2-5. 角層と表皮の採取

抜毛後のマウスを頸椎脱臼により屠殺し、角層と表皮の採取を行った。角層は、シアノアクリレート樹脂 (アロンアルファ A) (三共, 東亜合成株式会社, 東京, 日本) を塗布したガラス板をマウス皮膚に押しつけ、1 分後に剥がすことで採取した。表皮は下記の方法で採取した。マウス皮膚を解剖用はさみで切り取り、皮下脂肪を除去した後、5 M 塩化ナトリウム中に入れた。37°C で overnight させ、皮膚を取り出し、スパーテルで表皮を掻き取った。掻き取った表皮は、乾燥させるためデシケータの中で 1 週間ほど放置し、その後重量を測定した。

2-6. RNA 抽出

抜毛後のマウスを頸椎脱臼により屠殺し、マウスの背部全層皮膚を 6 mm 生検トレパン (BIOPSY PUNCH, カイインダストリーズ, 関, 岐阜, 日本) を用いて採取した。マイクロチューブ中に RNAiso Plus 1 mL を加え、採取した皮膚を入れ、解剖用はさみで 2 分間細かく刻んだ。マイクロチューブにクロロホルム 200 μ L を加え、激しく攪拌し、4°C、12,000 \times g で 15 分間遠心分離した。なお、以降の操作は第 1 章 第 2 節 2-6. と同様である。

2-7. リアルタイム PCR

SMS2KOマウスの皮膚中セラミド代謝関連酵素の遺伝子発現量をリアルタイム PCR により検討した。実験操作は、第 1 章 第 2 節 2-7.と同様の操作を行った。検討したセラミド代謝関連酵素は、SPT-1、2、SMS1、2、GCS、a-SMase、 β -GCase とした。以下に各酵素のプライマー配列を示す (Table 5)。

Table 5 Primer Sequence

Primer		Sequence
GAPDH	Forward	5' -CCATGGAGAAGGCTGGGG- 3'
	Reverse	5' -CAAAGTTGTCATGGATGAGC- 3'
SPT-1	Forward	5' -AGGGTTCTATGGCACATTTGATG- 3'
	Reverse	5' -TGGCTTCTTCGGTCTTCATAAAC- 3'
SPT-2	Forward	5' -CAAAGAGCTTCGGTGCTTCAG- 3'
	Reverse	5' -GAATGTGTGCGCAGGTAGTCTATC- 3'
SMS-1	Forward	5' -TGGGCGTTTTCTATTTGCGA- 3'
	Reverse	5' -GTACAGCGTGCCAACTATGC- 3'
SMS-2	Forward	5' -CCACCAACACTTACACAAGC- 3'
	Reverse	5' -GCACCCTTTCGTAACCCGTT- 3'
GCS	Forward	5' -GCGTGTTATCCATGTGATGCTTG- 3'
	Reverse	5' -TGGGCTGGCTCAGTAAGATGAA- 3'
β -GCase	Forward	5' -GTGACTTCTCCATCCGTGTCT- 3'
	Reverse	5' -CGTAGGTTTCATTCTCCGCTGT- 3'
a-SMase	Forward	5' -TGGCTCTATGAAGCGATGGC- 3'
	Reverse	5' -TTGAGAGAGATGAGGCGGAGAC- 3'

2-8. SMS2KO マウスへの UVB 照射と TEWL 測定および角層採取

2-4.と同様の操作を行った後、マウスを下記の群構成に分けた。

- WT (Normal)
- SMS2KO (Normal)
- WT (250 mJ/cm² UVB)
- SMS2KO (250 mJ/cm² UVB)

抜毛した次の日を 0 日目とし、UVB 照射前に麻酔下で VAPO SCAN により TEWL を測定した。測定後、UVB を PHILIPS BROADBAND (TL 20W/12RS, Edmundson Electrical, Knutsford, Cheshire, U.K.) を用いて 250 mJ/cm² となるようにマウスに照射した。照射後は 1 日目から 4 日目まで、1 日 1 回照射部位の TEWL 測定を行った。4 日目の TEWL 測定後に、2-5. と同様の方法でマウスの角層を採取した。

2-9. SMS2KO マウスへの創作製と創面積測定

麻酔した抜毛後のマウスの全層皮膚を 6 mm 生検トレパンを用いて打ち抜き、創を作製した。創はマウスの背部片側 1 カ所ずつ、計 2 カ所作製した。Molecular Imager® (ChemiDocTM XRS+ with Image Lab software, BIORAD, Hercules, CA, U.S.A.) により創を撮影し、創面積の測定を行った。創作製日を 0 日目とし、11 日目まで創面積の測定を行った。0 日目の創面積を 100% とし、経時的な面積率を算出した。算出方法を下記に示す。

$$\text{Wound area (\%)} = \text{wound area (day x)} / \text{wound area (day 0)} \times 100$$

2-10. マウスへのテープストリッピング処理と TEWL 測定

抜毛後、麻酔下のマウスに対してテープストリッピング (tape stripping: TS) 処理を行った。TS 前にマウス背部皮膚の TEWL を測定し、測定後に梱包用テープ (ニチバン株式会社, 東京, 日本) をマウスの腹部から背部にかけて巻き付けるように貼り付け、30 秒間放置した。その後、テープを慎重にはがし、再度 TEWL の測定を行った。この操作を 3 回繰り返した。

2-11. 脂質抽出 ³⁶⁾

2-5.および 2-8.の操作で採取した角層をバイアルに入れ、ヘキサン:エタノール (95 : 5) を 5 mL 入れた。37°C で 20 分間超音波処理し、角層細胞間脂質を抽出した。抽出液はフィルタ濾過 (Millex Gn 0.20 μ m) を行い、乾固した後、クロロホルム:メタノール (2 : 1) で再溶解し、再度乾固した。ガラス板に残った角層の重量を測定するため、角層が入ったバイアル中に NN-DMF を 10 mL 入れ、37°C で 15 分間超音波処理し、ガラス板から角層を剥がした。剥がした角層はあらかじめ重量を測定したフィルタを用いて濾過し、その後数回メタノールで濾過した。フィルタはデシケータの中に入れ、減圧下で 1 週間から 2 週間放置し、再び重量を測定した。濾過後のフィルタ重量と濾過前のフィルタ重量の差から角層重量を算出した。表皮は、マイクロチューブ内にクロロホルム:メタノール (2 : 1) を 1 mL 入れ、解剖用はさみで細かく刻んだ後、37°C で 20 分間超音波処理して表皮中の脂質を抽出した。抽出液はフィルタ濾過し、角層脂質と同様に乾固した。

2-12. HPTLC による脂質定量

第 2 節 2-3.および 2-11.と同様の方法で角層および表皮中のセラミド量

を定量した。なお、画像化と定量には Molecular Imager® (ChemiDoc™ XRS+, Hercules, CA, U.S.A.) を用いた。

2-13. HE 染色による皮膚形態観察

抜毛後のマウスを頸椎脱臼により屠殺し、解剖用はさみを用いて皮膚を採取した。O.C.T.コンパウンド (サクラファインテック株式会社, 名古屋, 愛知, 日本) を用いて包埋し、ドライアイスにより凍結させた。凍結切片は、LEICA CM3050 S (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Germany) により、内部温度 (CT) -25°C、台座温度 (OT) -25°C、切片厚 10 µm の条件で 1 匹につき 8 枚作製した。切片はヘマトキシリン・エオジン (hematoxylin-eosin: HE) 染色を行った。切片を 10%ホルマリン溶液に 30 分ほど浸漬し、組織を固定した。その後流水水洗し、100、90、80、70%エタノールの順に浸漬し、脱水を行った。脱水後、ヘマトキシリン溶液に 6 分間浸漬し、ぬるま湯で流水水洗した。酢酸を含んだエオシン Y 液に切片を浸漬し、すぐに流水水洗した。70、80、90、100%エタノールの順に浸漬し、キシレンに浸け、マルチマウント 480 (松浪硝子工業株式会社, 大阪, 日本) により封入し、倒立型顕微鏡 (OLYMPUS IX-71, 東京, 日本) で観察した。

2-14. 表皮厚の測定

HE 染色後の皮膚切片を倒立型顕微鏡で観察し、ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, U.S.A.) により表皮厚を測定した。薄切切片 1 枚につき 10 カ所の表皮厚を測定した。

2-15. 統計解析

SAS 統計解析システム ver. 9.2 (SAS Institute, Cary, NC, U.S.A.) を使用

し、 p 値を算出した。統計解析法には、paired t-test および Tukey の多重検定を用いた。

第3節 結果

3-1. SMS2KO マウスの TEWL

SMS2KO マウスの TEWL を測定し、WT と比較した。その結果、4 週齢において WT の TEWL は 8.76、SMS2KO は 13.6 となった。8 週齢において WT の TEWL は 5.38、SMS2KO は 7.62 となり、4 および 8 週齢ではいずれも SMS2KO マウスのほうが有意に高い値であった。一方、12 週齢の WT の TEWL は 10.6、SMS2KO は 10.7 であり有意な差は認められなかった (Fig. 8)。

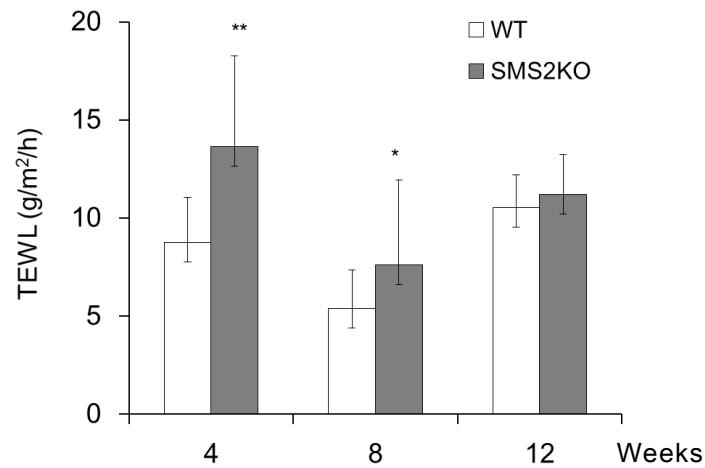


Fig. 8 TEWL of dorsal skin in WT and SMS2KO. Values are the mean \pm S.D. of ten to fifteen experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, student's t -test (paired).

3-2. SMS2KO マウスのセラミド代謝関連酵素の遺伝子発現量

8 週齢 SMS2KO マウスのセラミド代謝関連酵素の遺伝子発現量測定を定量的リアルタイム PCR により行った。各遺伝子発現量は、WT の発現量を 1 としたときの相対値として示した。SMS2 遺伝子発現量は SMS2KO では検出されなかった。SPT1、SPT2、SMS1、 β -GCase および α -SMase の遺伝子発現量は WT と SMS2KO の間に差は認められなかった。GCS の遺伝子発現量は WT の 1.73 倍となり、WT と比較して増加傾向を示した ($p = 0.06$) (Fig. 9)。

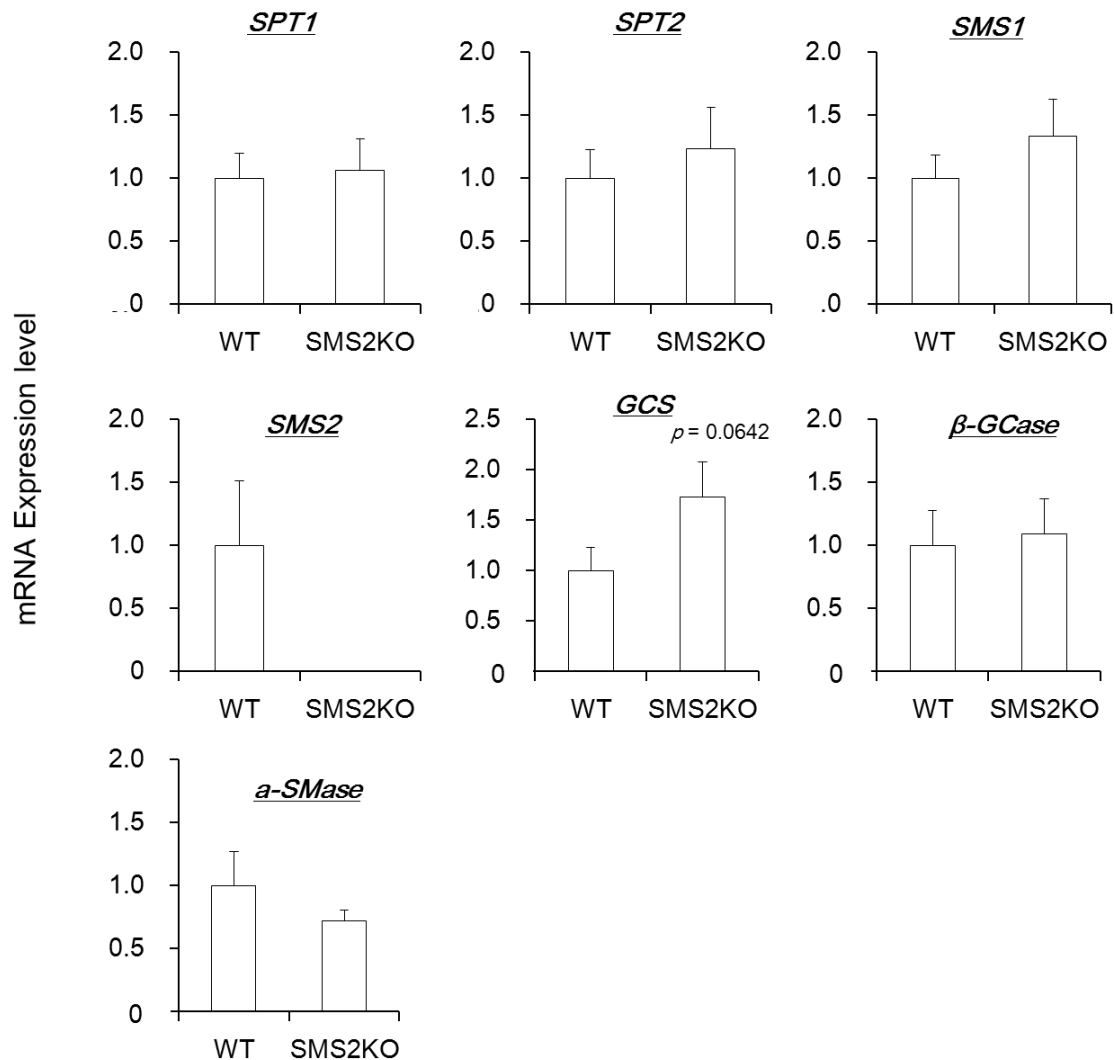


Fig. 9 mRNA expression levels of ceramide metabolic enzymes in SMS2KO mice skin. Values are the mean \pm S.D. of four experiments. (student's *t*-test.)

3-3. SMS2KO マウスの表皮および角層中セラミド量

8 週齢 SMS2KO マウスの表皮中のセラミド量を HPTLC により定量し、WT と比較した。セラミド量は採取した表皮の重量で補正した。WT、SMS2KO それぞれのセラミド量は、セラミド[NS]は 14.1、8.98 $\mu\text{g}/\text{epidermis mg}$ 、セラミド[NP]は 10.2、7.76 $\mu\text{g}/\text{epidermis mg}$ 、セラミド[AS]は 13.2、8.99 $\mu\text{g}/\text{epidermis mg}$ 、セラミド[AP]は 0.44、0.28 $\mu\text{g}/\text{epidermis mg}$ であった。セラミド[NS]および[NP]は WT と比較して SMS2KO マウスに減少傾向が認められた ($p = 0.09, 0.08$)。また、セラミド[AP]は SMS2KO マウスで有意な減少が認められた (Fig. 10)。

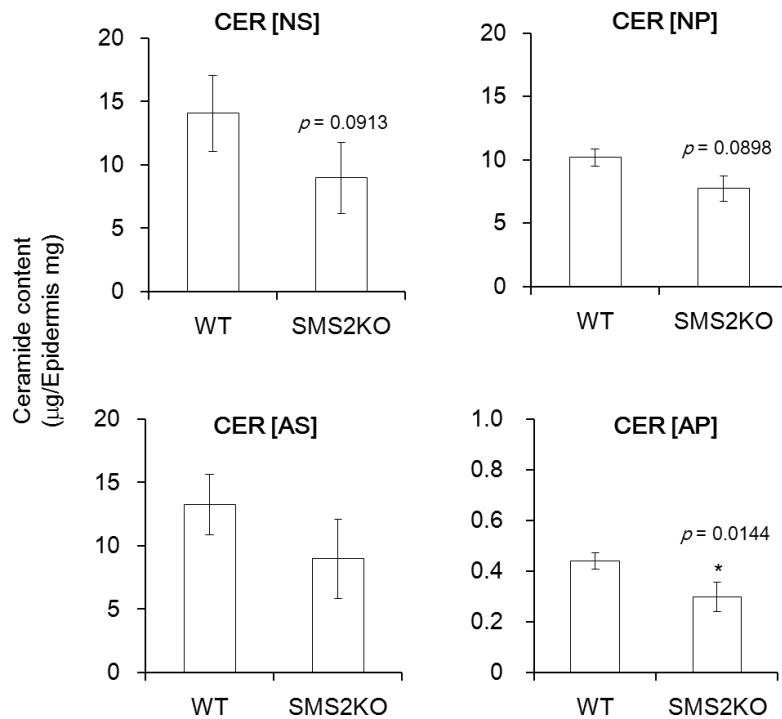


Fig. 10 Ceramide[NS], [NP], [AS] and [AP] contents in SMS2KO mice epidermis. Values are the mean \pm S.D. of three experiments. * $p < 0.05$, student's *t*-test.

さらに、SMS2KO マウスの角層中セラミド量を HPTLC により定量し、WT と比較した。なお、セラミド量は採取した角層の重量で補正した。4 週齢 WT、SMS2KO それぞれのセラミド量について調べたところ、セラミド[NS]は 18.59、8.75 $\mu\text{g}/\text{SC mg}$ となり、SMS2KO マウスに減少傾向が認められた ($p = 0.06$)。また、セラミド[NP]は 9.75、2.19 $\mu\text{g}/\text{SC mg}$ となり、SMS2KO マウスに有意な減少が認められた。8 週齢 WT、SMS2KO それぞれのセラミド量では、セラミド[NS]が 29.3、21.4 $\mu\text{g}/\text{SC mg}$ 、セラミド[NP]が 9.73、7.56 $\mu\text{g}/\text{SC mg}$ であった。これらから明らかなように、セラミド[NS]および[NP]はいずれも WT と比較して SMS2KO マウスの方が有意に減少した。また、12 週齢 WT、SMS2KO セラミド[NS]は 29.5、40.0 $\mu\text{g}/\text{SC mg}$ 、セラミド[NP]は 21.5、20.8 $\mu\text{g}/\text{SC mg}$ であった。12 週齢においてはセラミド[NS]、[NP]いずれも WT と差はなかった。なお、セラミド[AS]および[AP]は角層中の含有量が少なく、定量限界以下であった。

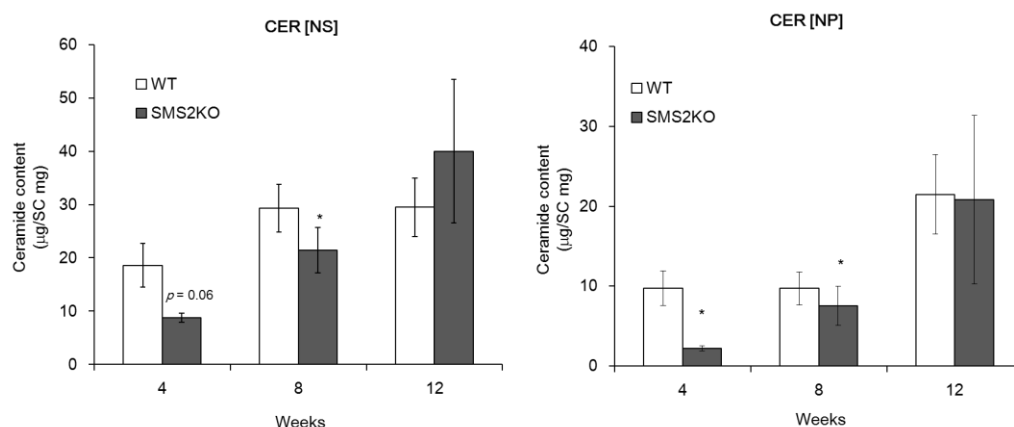


Fig. 11 Ceramide[NS] and [NP] contents in SMS2KO mice stratum corneum. Values are the mean \pm S.D. of three to six experiments. * $p < 0.05$, student's t -test.

3-4. UVB 照射による SMS2KO マウス TEWL

8 週齢 SMS2KO マウス背部に 250 mJ/cm^2 の UVB を単回照射した。照射日を 0 日目とし、経時的に TEWL を測定した。UVB 非照射群の WT、SMS2KO マウスの TEWL は 0 日目では 3.84、5.00、3 日目の TEWL は 3.91、4.91 で、非照射群の経時的な TEWL の変動は認められなかった。一方、UVB 照射群の WT、SMS2KO マウスそれぞれの TEWL は 0 日目では 4.95、5.63 となり、UVB 照射後には経時的に TEWL が増加した。また、3 日目では、WT、SMS2KO マウスの TEWL はそれぞれ 46.0、55.4 となり、UVB 照射によって WT も SMS2KO マウスも TEWL が上昇したが、照射 WT と比較して、SMS2KO マウスの TEWL は有意に上昇した (Fig. 12)。

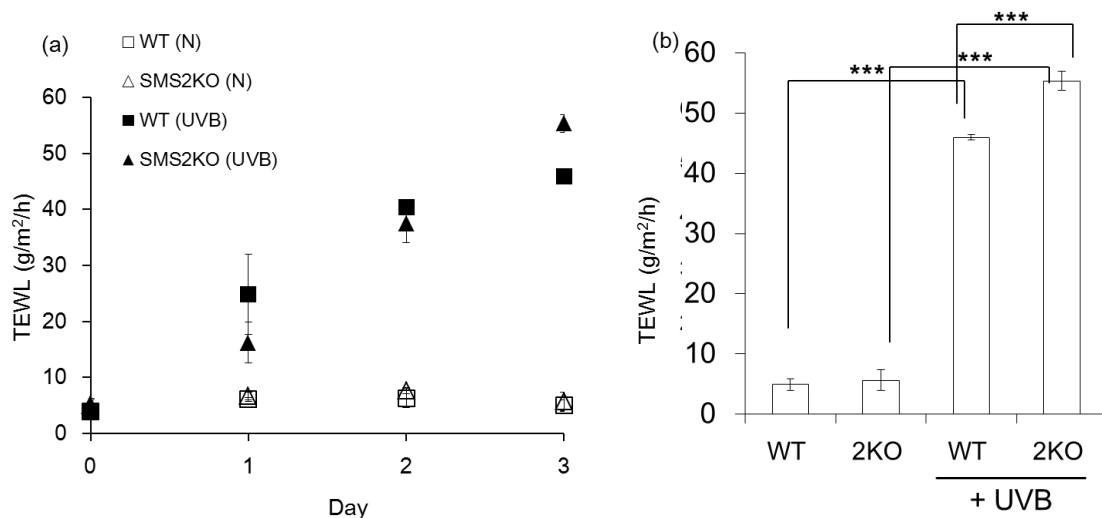


Fig. 12 Change in TEWL of SMS2KO mice after UVB irradiation. (a) Time course of values of TEWL. Open rectangle: WT (normal), open triangle: SMS2KO (normal), close rectangle: WT (UVB), close triangle: SMS2KO (UVB). (b) Values of TEWL on day 3. Values are the mean \pm S.D. of three experiments. *** $p < 0.001$, Tukey's test.

3-5. UVB 照射による SMS2KO マウス角層セラミド量

8 週齢 SMS2KO マウス背部に 250 mJ/cm^2 の UVB を単回照射した。照射日を 0 日目とし、4 日目に照射部位の角層を採取し、角層セラミドの定量を行った。その結果、UVB 非照射群の WT、SMS2KO マウスと比較して、UVB 照射 WT、SMS2KO マウスの角層中セラミド[NS]および[NP]量は有意に減少した。照射 WT と照射 SMS2KO マウス間にはセラミド量の差は認められなかった (Fig. 13)。セラミド[AS]および[AP]は角層中の含有量が少なく、定量限界以下であった。

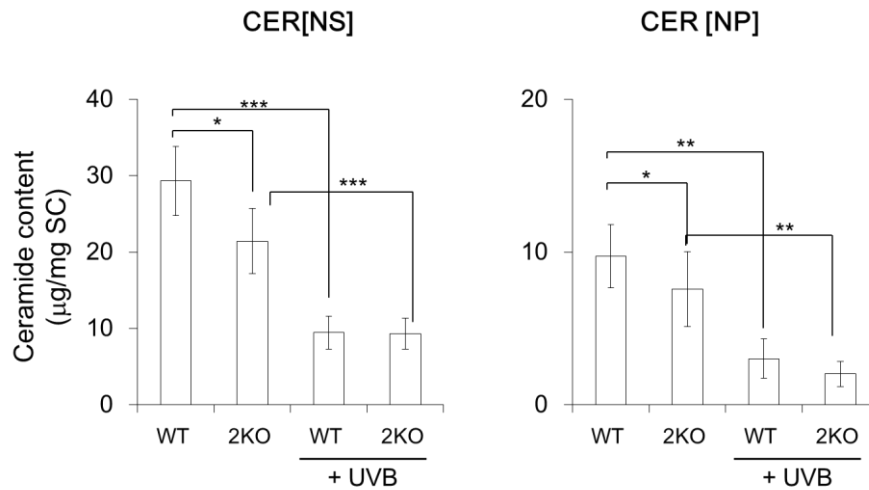


Fig. 13 Ceramide[NS] and [NP] contents in SMS2KO mice stratum corneum after UVB irradiation. Values are the mean \pm S.D. of three to six experiments.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Tukey's test.

3-6. SMS2KO マウスへの創作製および経時的な創治癒率

8 週齢 SMS2KO マウスに対し、生検トレパンを用いて創作製を行い、創の面積を経時的に測定した。Table 6 に示すように、WT、SMS2KO いずれも左右で理論上の面積とほぼ同じ面積の創を作製することができた。創作製日の創面積を 100% とすると WT、SMS2KO いずれも経時的に創面積は減少し、11 日目で完治した。背部右側の創では、5 日目において WT と比較して SMS2KO の面積が大きくなったが、それ以外では差はなかった (Fig. 14)。

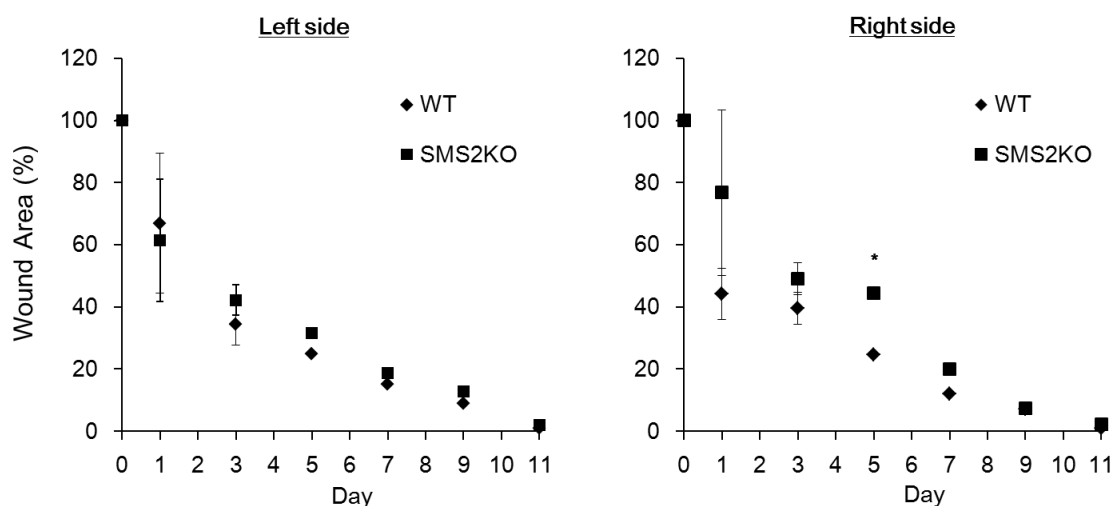


Fig. 14 Wound area at the different time points after wounding. Each time point is the mean wound area percentage of the original wound. Values are the mean \pm S.D. of three experiments. * $p < 0.05$, student's t -test.

Table 6 The theoretical wound area.

	WT	SMS2KO
Area (3 mm \times 3 mm \times 3.14)	28.26	
Left side	28.82 \pm 0.05	30.00 \pm 0.17
Right side	29.19 \pm 0.28	26.44 \pm 0.12

3-7. SMS2KO マウス TEWL に対する TS 処理の影響

8 週齢 SMS2KO マウスに TS 処理を行い、処理回数ごとの TEWL を測定した。TS 処理前の WT、SMS2KO それぞれの TEWL は 7.02、13.0 となり、SMS2KO マウスで有意な上昇が認められた。1 回 TS 処理により WT、SMS2KO それぞれの TEWL は 11.5、28.5 に上昇し、2 回 TS 処理により WT、SMS2KO それぞれの TEWL は 33.4、52.6 に上昇した。また、3 回 TS 処理により WT、SMS2KO それぞれの TEWL は 61.1、71.1 に上昇した。このように、TS を重ねるごとに TEWL は上昇し、SMS2KO は顕著に上昇した。

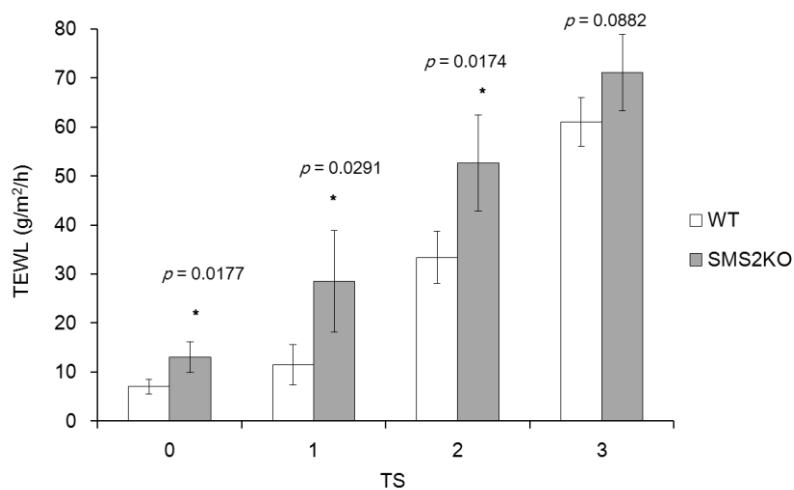


Fig. 15 Change in TEWL of SMS2KO mice after tape stripping treatment. Values are the mean \pm S.D. of three or four experiments. * $p < 0.05$, student's t -test.

3-8. HE 染色による SMS2KO マウスの皮膚形態観察および表皮厚測定

SMS2KO マウス皮膚の薄切切片を作製し、HE 染色後に形態の観察および表皮厚を測定した。4 週齢 WT、SMS2KO のそれぞれの表皮厚は 17.2、17.7 μm であり、8 週齢 WT、SMS2KO のそれぞれの表皮厚は 18.5、22.1 μm であり、WT と差はなかった。一方、12 週齢 WT、SMS2KO のそれぞれの表皮厚は 18.5、27.3 μm であり、SMS2KO マウスのほうが有意に厚くなった (Fig. 16)。

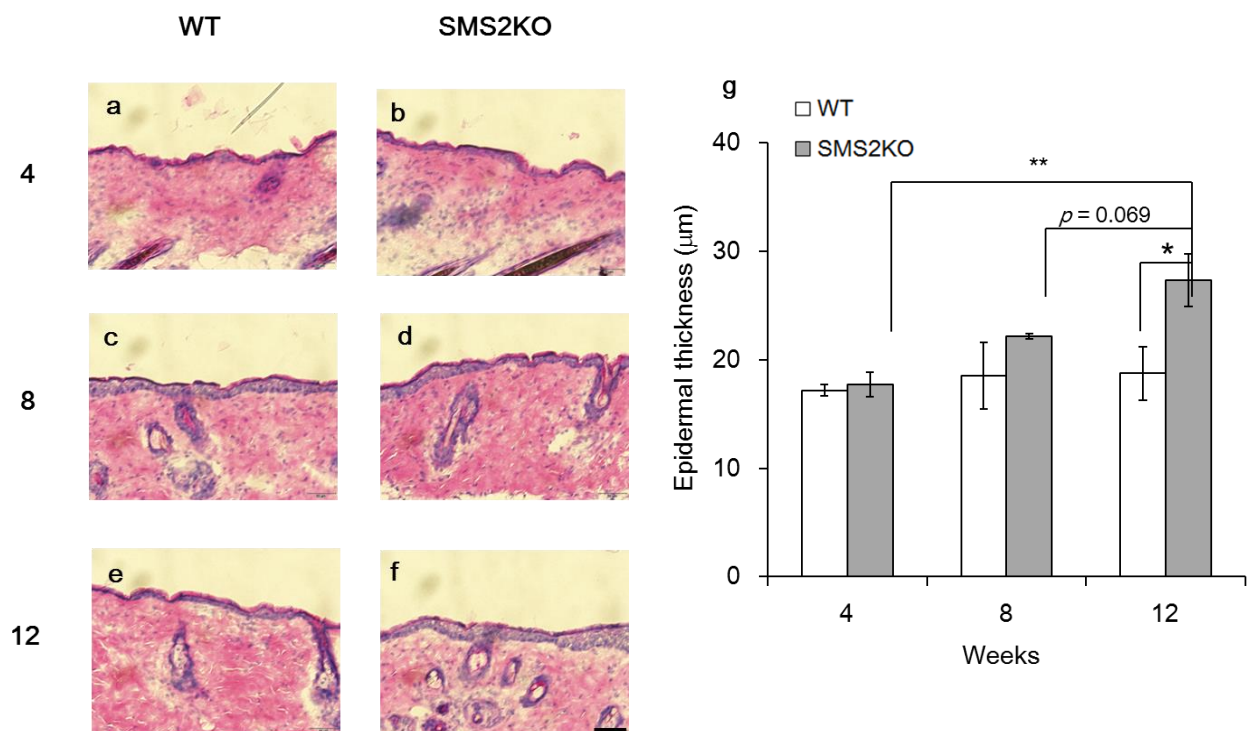


Fig. 16 Changes in skin morphology and epidermal thickness at 4, 8 and 12 weeks mice. HE-stained sections (a-f). WT at 4 (a), 8 (c) and 12 (e) weeks, SMS2KO at 4 (b), 8 (d) and 12 (f) weeks. Epidermal thickness (g). Skin samples were fixed and stained with hematoxylin and eosin. Bar = 50 μm . Values are the mean \pm S.D. of three to four experiments. * $p < 0.05$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Tukey's test.

第4節 考察

本章では、SMS2KOマウスの皮膚表現型に関する基礎的検討を行った。

はじめに、皮膚バリア機能を評価する指標の1つとなる TEWL を測定した。4 および 8 週齢の SMS2KO マウスの TEWL はそれぞれの週齢の WT よりも有意に上昇していることが示された。TEWL は表皮から一定時間に蒸散する水分量を示し、値が高いほど蒸散量が多い。アトピー性皮膚炎をはじめとする皮膚疾患では患部の TEWL 値が高いことが知られている^{37, 38)}。このことから、4 および 8 週齢 SMS2KO マウスは、WT と比較して皮膚のバリア機能が弱まっている可能性がある。一方、12 週齢 SMS2KO マウスの TEWL は、WT と比較して差は認められなかった。このことから SMS2KO マウスのバリア機能は週齢によって異なり、12 週齢では正常に近くなることが示された。

次に、8 週齢 SMS2KO マウスの全層皮膚を用い、セラミド代謝関連酵素の遺伝子発現量をリアルタイム PCR により検討した。SMS2 は KO マウスにおいて検出されなかったため、SMS2 遺伝子は欠損されていることを確認した。WT と比較して SPT1、2、SMS1、 β -GCase および a-SMase の遺伝子発現量には差は認められなかった。GCS の遺伝子発現量は SMS2KO マウスで増加傾向が示された。当研究室の以前の検討で 4 週齢 SMS2KO マウスでは、全層皮膚中の SMS および GCS 活性の低下および表皮中 SM 量の減少傾向が認められている（論文投稿中）ことから、SMS2KO マウス皮膚の表現型は週齢によって異なる可能性が考えられた。さらに遺伝子発現量や酵素活性、脂質量の変動が必ずしも一致するわけではないため、今後は各週齢のセラミド代謝関連酵素の遺伝子発現量や酵素活性、皮膚中脂質量を検討する必要がある。

次に、8 週齢の SMS2KO マウス表皮中のセラミド量および各週齢 SMS2KO マウスの角層中のセラミド量を、HPTLC により定量した。SMS2KO マウスの表皮中セラミド[NS]および[NP]量は、WT と比較して

減少傾向を示し、セラミド[AP]は有意に減少した。さらに、4 および 8 週齢 SMS2KO マウスの角層中セラミド[NS]および[NP]量は WT よりも有意に減少しており、どちらも 12 週齢では差はなかった。SMS2KO マウスの角層中セラミド[NS]、[NP]量は週齢依存的に増加し、12 週齢では WT と差がなかった。第 1 章でも述べたように、セラミドは SM とグルコシルセラミドから生成され、SM はセラミド[NS]と[AP]を生成し、グルコシルセラミドは全てのセラミド種を生成する^{7,8)}。4 週齢の SMS2KO マウスでは皮膚中の SMS と GCS 活性が有意に減少した (論文投稿中)。また、4 週齢の SMS2KO マウスは皮膚中 SM 量も減少しており、その結果として皮膚中セラミド量が減少したことが考えられる。8 週齢 SMS2KO マウスも同様の機構でセラミド量が減少した可能性がある。また、SMS2KO マウスの TEWL は 4 および 8 週齢で上昇していたことから、SMS2KO マウスは皮膚中セラミド量の減少に伴い、皮膚バリア機能も弱まっていることが示唆された。さらに、4 週齢 SMS2KO マウスの角層中コレステロール量が減少していることも示されており、これも皮膚バリア機能の減弱の一因と考えられる (未発表データ)。

SMS2KO マウスは皮膚バリア機能が減弱していることが示唆されたため、続いて SMS2KO マウスの種々バリア破壊方法に対する回復応答性を調査した。まず、8 週齢 SMS2KO マウスに対して 250 mJ/cm^2 の UVB を単回照射し、経時的に TEWL を測定後、角層中のセラミドを定量した。その結果、UVB 照射後に WT、SMS2KO とともに TEWL は経時的に上昇し、照射後 3 日で最大となった。3 日目の TEWL は UVB 照射 WT と比較して UVB 照射 SMS2KO マウスで有意に高い値となった。4 日目に角層を採取し、HPTLC により角層中のセラミドを定量した。UVB 照射 WT、SMS2KO マウスともに非照射マウスよりも角層中のセラミド[NS]、[NP]量が有意に減少したが、両者に量的な差はなかった。SMS2KO マウスの

UVB 照射前の TEWL は WT よりも高く、UVB 照射によってさらなるバリア破壊が引き起こされたことが考えられる。UVB 照射によって細胞内セラミドは増加することが報告されている³⁹⁾が、角層セラミド量は UVB 照射によって減少した。これには、角層セラミド量は細胞外セラミドであること、そして、UVB によりマウスに一部落屑が認められたことが理由として考えられる。一般的に、UV を皮膚に照射すると TEWL の増加に伴うバリア破壊やアポトーシスが引き起こされる⁴⁰⁻⁴²⁾。UVB は真皮直上層まで到達し、TNF- α 、COX-2、IL-1 や 6 の産生が促進され、炎症反応を示す⁴³⁻⁴⁶⁾。TNF- α などの炎症性サイトカインの刺激により、3 次元培養皮膚ではセラミドが変動する報告もある⁴⁷⁾。SMS2KO マウスは、リポ多糖刺激による肺の障害と炎症が抑制されることが報告されており⁴⁸⁾、SMS2KO マウスは炎症が抑制される可能性があるため、今後は UVB 照射に併せて炎症マーカーの発現を調査する必要がある。次に、8 週齢 SMS2KO マウスの全層皮膚を生検トレパンで打ち抜いて創を作製し、その面積を経時的に計測した。その結果、WT、SMS2KO マウスともに経時的に創面積は減少し、11 日目で完治した。創治癒において WT と SMS2KO マウス間に差は認められなかった。SM がスフィンゴミエリンデアシラーゼによって代謝されて生じる sphingosylphosphorylcholine (SPC) は、ヒト皮膚線維芽細胞での結合組織成長因子 (connective tissue growth factor : CTGF) の発現を誘導し、創傷治癒を増強することが報告されている^{49, 50)}ことから、SMS2KO マウスでは創治癒に何らかの差があることを予想したが、予想と異なる結果となった。今後は創の大きさや筋層までの傷つけを考慮し、創治癒に関するマーカーの発現などを調べる必要がある。さらに、8 週齢 SMS2KO マウスに TS 処理を行い、処理後の TEWL を測定し、WT と比較した。その結果、TS ごとに WT、SMS2KO マウスともに TEWL は上昇した。特に SMS2KO マウスの TEWL

上昇は顕著であり、1 および 2 回目では同回数の WT と比較して有意に TEWL 値は上昇した。3 回目においても SMS2KO マウスの TEWL 値が高い傾向になった。TS は角層を物理的に除去する方法であるため、SMS2KO マウスの角層は 1 度に多く剥がれやすいことや、角層が構造的に脆弱である可能性も考えられる。種々バリア破壊方法による TEWL の結果から、SMS2KO マウスの皮膚バリア機能は減弱しており、バリア破壊に対する感受性が高いことが示唆された。

最後に、週齢ごとの SMS2KO マウスの皮膚形態を HE 染色によって観察し、表皮厚の測定を行った。4、8 週齢 SMS2KO マウスの表皮厚は WT と同程度であった。12 週齢においては、WT と比較して SMS2KO マウスの表皮は有意に厚くなった。また、今回検討した週齢全ての WT マウスの表皮は同程度の厚さであったが、SMS2KO マウスは週齢によって表皮厚が変化した。SMS2KO マウスの遺伝的背景である C57BL/6 や皮膚関連の研究で多く使用されているヘアレスマウスおよびその他のマウスの表皮厚は、22 週齢ほどまでは 10-20 μm であるという報告がある⁵¹⁻⁵⁵⁾。このことから、12 週齢 SMS2KO マウスは表皮が肥厚していることが考えられる。表皮の肥厚は炎症反応や表皮角化細胞の増殖・分化異常の際に多く認められ、特に UV の暴露を受けると顕著となる。炎症の場合は TNF- α や IL-1 や 6 産生が促進され⁴³⁻⁴⁶⁾、炎症反応が起こる。表皮は、基底層の表皮角化細胞の増殖や分化に伴って K-5 や K-10 など特異的なマーカーを発現することが知られている⁵⁶⁾。SMS2KO マウスは炎症反応が WT と異なる可能性があるため、12 週齢の SMS2KO マウス皮膚中では炎症マーカーや分化マーカーの発現が変動している可能性がある。さらに、12 週齢 SMS2KO マウスの TEWL は WT と差がないにも関わらず、表皮が肥厚していることから、皮膚のバリア機能と表皮の肥厚が正の相関になっているとは限らない。今後は週齢ごとの炎症、分化マーカーの発現

を調査することで、SMS2KO マウスの表現型が詳細に解明できることが考えられる。

本章では、SMS2KO マウスの皮膚バリア機能に着目した表現型の検討を行い、SMS2KO マウスは皮膚バリア機能が弱いことを示し、週齢とともに改善する傾向を示した。一方で、SMS2 が皮膚の炎症や分化に関与する可能性も見いだした。SMS には 3 種類のアイソザイムが存在し、そのうちの SMS1 および 2 が SM 合成能を有する。SMS の機能解析を目的とし、SMSKO マウスの作製とその研究が行われてきたが、SMS1KO マウスは胎生致死や雄性マウスの精子数減少など、研究のための安定供給が困難であった。しかし、Cre/loxP システムを用いた SMS1KO マウスの作製が可能となり、SMS1 の機能解析に用いられるようになってきた。第 3 章では Cre/loxP システムにより作製した SMS1KO マウスを用い、皮膚表現型の検討を行った。

第 3 章

スフィンゴミエリン合成酵素 1 ノックアウトマウス 皮膚表現型の基礎的検討

第 1 節 緒論

SMS1 は SMS のアイソザイムのひとつであり、第 2 章で述べたようにセラミドとホスホコリンから SM とジアシルグリセロールを生成する。SM の合成の寄与は SMS2 よりも SMS1 のほうが大きいことが知られている²⁸⁾。これまでに、SMS 遺伝子のノックアウト (knockout: KO) マウスが作製され、SMS の機能解析を目的とした研究が進んでおり、SMS1KO マウスでは、表現型として胎生致死、体重減少、血小板数減少、活性酸素の蓄積、インスリン分泌低下³¹⁾、血漿や肝臓中での SM 減少³²⁾などが報告されているが、SMSKO マウスの皮膚での表現型や、SMSKO マウスを用いた皮膚中 SMS 機能解析については未だ報告されていない。

SMS1KO マウスの表現型は SMS2KO マウスが呈する表現型よりも重篤なものが多く、特に、胎生致死のため、研究のための安定供給が困難であった。生体にとって SMS1 の機能維持は重要であることが予想できるが、成体 SMS1KO マウスを用いた研究はあまり進んでいない。このように KO することで胎生致死など、重篤な表現型を呈してしまう遺伝子に対して、その機能研究を目的に用いられる方法のひとつに Cre/loxP システムがある。

Cre は loxP という 34 bp の配列を認識し、2 つの loxP に挟まれた遺伝子領域を切り出すことが可能である。これを利用し、標的遺伝子 (SMS1) のエクソンや重要なドメインを loxP で挟むことでターゲティングを行う⁵⁷⁻⁵⁹⁾。この loxP を有するマウスと Cre を発現しているマウスを交配させることで目的遺伝子の切り出しが可能となる。Cre/loxP システムにより、KO する時期の調節が可能となり、胎生致死の回避や成体での研究を行うことができる。

本章では、遺伝子組換え法である Cre/loxP システムを用いて作製した SMS1KO マウスを用い、第 2 章と同様に角層中セラミド量や TEWL の測定を行った。さらに、SMS1KO マウスに対して、SM を投与し、SMS1 の皮膚に対する影響を調査した。

第 2 節 方法

2-1. 使用動物

C57BL/6 を遺伝的背景として作製された SMS1KO マウスは、渡辺 研博士（国立長寿医療研究センター 運動器疾患研究部）より供与された。本章で用いた SMS1KO マウスは、マウス SMS1 遺伝子のエクソン 6 を 2 つの loxP により挟むことで KO を行った。供与されたマウスは 12 時間ごとの明暗サイクル環境下で、温度と湿度が管理された部屋で飼育した。試料や水は自由摂取とした。動物の飼育、実験は城西大学動物実験管理委員会および城西大学組替え DNA 実験安全委員会の承諾を得て「城西大学動物実験規定」に従って行った。実験は 30 週齢前後の雌雄マウスを用いて行った。

2-2. 実験材料

5% SM-L は株式会社シャローム（忍野村，山梨，日本）から供与された。ジエチルエーテルは和光純薬工業株式会社（大阪，日本）から購入した。その他の試薬は第 2 章と同様のものを使用した。

2-3. SMS1KO マウスの TEWL 測定

第 2 章 第 2 節 2-4.と同様の方法で測定を行った。

2-4. SMS1KO マウスの角層採取

第 2 章 第 2 節 2-5.と同様の方法で角層を採取した。

2-5. 脂質抽出および HPTLC による脂質定量

採取した角層を第 2 章 第 2 節 2-11,12 と同様の方法で角層中の脂質を抽出し、HPTLC によりセラミドを定量した。さらに、角層中コレステロール量を同様の操作で定量した。コレステロールの分離には、ヘキサ

ン：ジエチルエーテル：酢酸（80：20：1, v/v）を用いた。

2-6. SM の腹腔内投与

SMS1KO マウスを 4 匹ずつ下記の群に分けた。

- WT (Normal)
- SMS1KO (Normal)
- WT (SM-L)
- SMS1KO (SM-L)

SMS1KO マウスに 400 mg/kg となるように 5% SM-L を腹腔内投与した。投与は 1 日 1 回、1 週間に 3 回行った。これを 4 週間継続した。最終投与の 1 日後に背部の毛を抜毛し、TEWL を測定した。

TEWL 測定後、マウスを屠殺し、角層の採取と HE 染色用の薄切切片の作製を行い、脂質抽出後に HPTLC により脂質定量を行った。薄切切片は HE 染色後、顕微鏡で形態観察を行った。表皮厚は ImageJ により測定した。これらの作業は第 2 章と同様の方法で行った。

2-7. 統計解析

SAS 統計解析システム ver. 9.2 (SAS Institute, Cary, NC, U.S.A.) を使用し、*p* 値を算出した。統計解析法には、t-test および Tukey の多重検定を用いた。

第3節 結果

3-1. SMS1KO マウスの TEWL

SMS1KO マウスの背部皮膚 TEWL を測定し、WT と比較した。その結果、WT は 9.43、SMS1KO は 14.9 となり、SMS1KO マウスの TEWL は WT と比較して有意に高い値を示した。

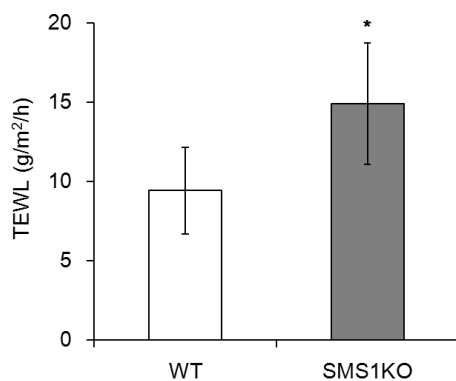


Fig. 17 TEWL of dorsal skin in WT and SMS1KO. Values are the mean \pm S.D. of five experiments. * $p < 0.05$, student's t -test.

3-2. SMS1KO マウス角層中セラミドおよびコレステロール量

SMS1KO マウスの角層中セラミドおよびコレステロール量を HPTLC により定量した。その結果 WT、SMS1KO マウスそれぞれのセラミド量は、[NS]は 31.5 $\mu\text{g}/\text{SC mg}$ 、28.3 $\mu\text{g}/\text{SC mg}$ となり、[NP]は 10.0 $\mu\text{g}/\text{SC mg}$ 、10.1 $\mu\text{g}/\text{SC mg}$ 、[AS]は 0.71 $\mu\text{g}/\text{SC mg}$ 、0.70 $\mu\text{g}/\text{SC mg}$ 、そして[AP]は 0.41 $\mu\text{g}/\text{SC mg}$ 、0.85 $\mu\text{g}/\text{SC mg}$ であった。今回定量したいずれのセラミド種は WT と SMS1KO マウス間に差は認められなかった。

また、WT のコレステロール量は 29.8 $\mu\text{g}/\text{SC mg}$ 、SMS1KO は 29.0 $\mu\text{g}/\text{SC mg}$ で、コレステロール量には差は認められなかった。

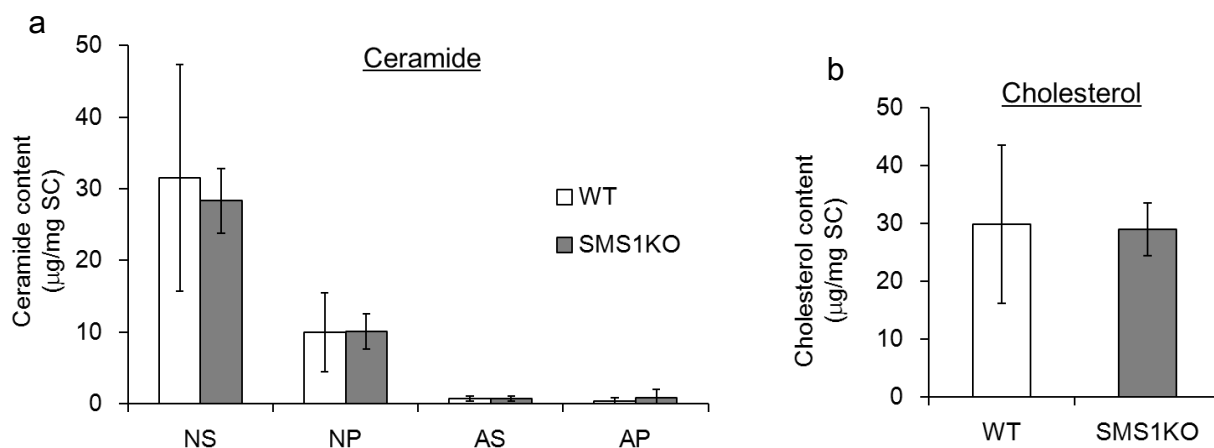


Fig. 18 Ceramide[NS], [NP], [AS] and [AP] contents in SMS1KO mice stratum corneum (a). Cholesterol contents in SMS1KO mice stratum corneum (b). Values are the mean \pm S.D. of five experiments.

3-3. SM 長期投与後の SMS1KO マウス TEWL

SMS1KO マウスに 400 mg/kg となるように 5% SM-L を腹腔内投与した。投与は 1 日 1 回、1 週間に 3 回行った。これを 4 週間継続し、投与終了後の TEWL を測定した。SM 非投与の WT、SMS1KO それぞれの TEWL は 9.43、14.9 となり、SMS1KO マウスで上昇傾向を示した。SM を投与した WT、SMS1KO それぞれの TEWL は 9.43、11.6 となった。SMS1KO マウスは SM の投与により TEWL は減少している傾向にあった。

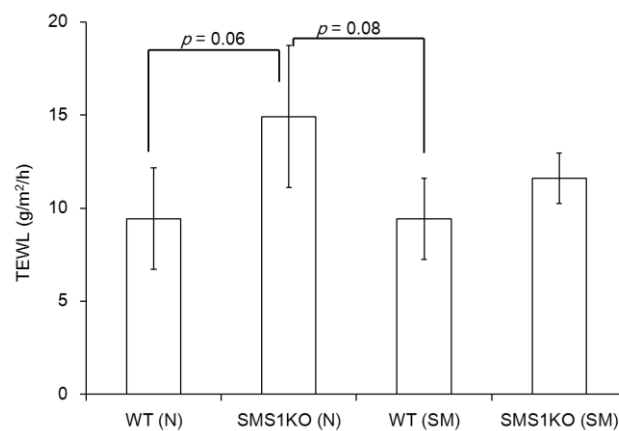


Fig. 19 TEWL of SMS1KO mice after long-term SM intra-abdominal injection. Values are the mean \pm S.D. of four experiments.

3-4. SM 長期投与後の SMS1KO マウス角層中脂質量

SMS1KO マウスに 400 mg/kg となるように 5% SM-L を腹腔内投与した。投与は 1 日 1 回、1 週間に 3 回行った。これを 4 週間継続し、投与終了 1 日後の角層中のセラミド量およびコレステロール量を WT と比較した。その結果、セラミド[NS]、[NP]、[AS]、[AP]量は、非投与群と投与群の間に差は認められず、また、WT と SMS1KO 間にも差はなかった。コレステロール量においても、非投与群と投与群の間に差は認められず、WT と SMS1KO 間にも差はなかった。

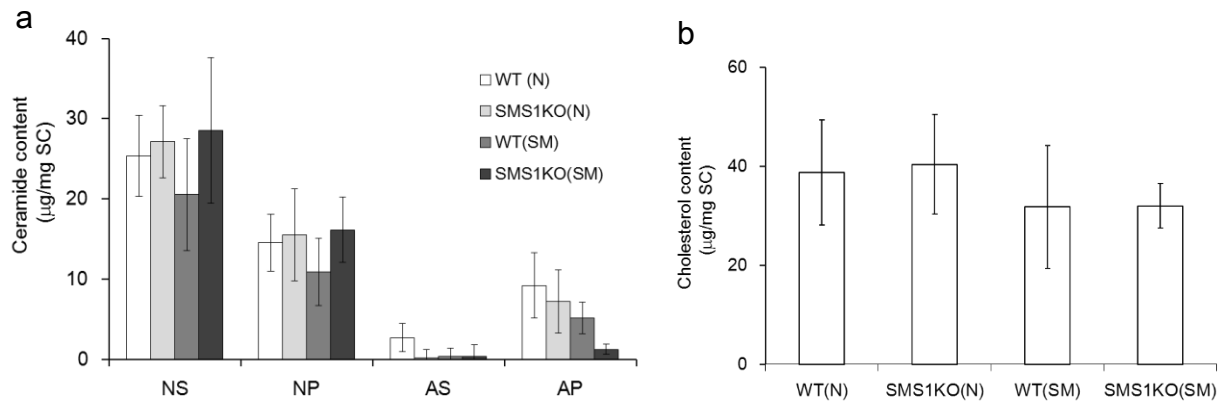


Fig. 20 Various ceramide (a) and cholesterol (b) content in SMS1KO mice stratum corneum after long-term SM intra-abdominal injection. Values are the mean \pm S.D. of four experiments.

3-5. SM 長期投与後の SMS1KO マウス表皮厚

SMS1KO マウスに 400 mg/kg となるように 5% SM-L を腹腔内投与した。投与は 1 日 1 回、1 週間に 3 回行った。これを 4 週間継続し、投与終了 1 日後に皮膚を採取し、HE 染色後、皮膚形態の観察と表皮厚の測定を行った。それぞれの群の表皮厚は、WT (Normal) は 10.9 μm 、SMS1KO (Normal) は 13.8 μm 、WT (SM-L) は 10.8 μm 、SMS1KO (SM-L) は 11.5 μm であり、表皮厚に差はなかった。

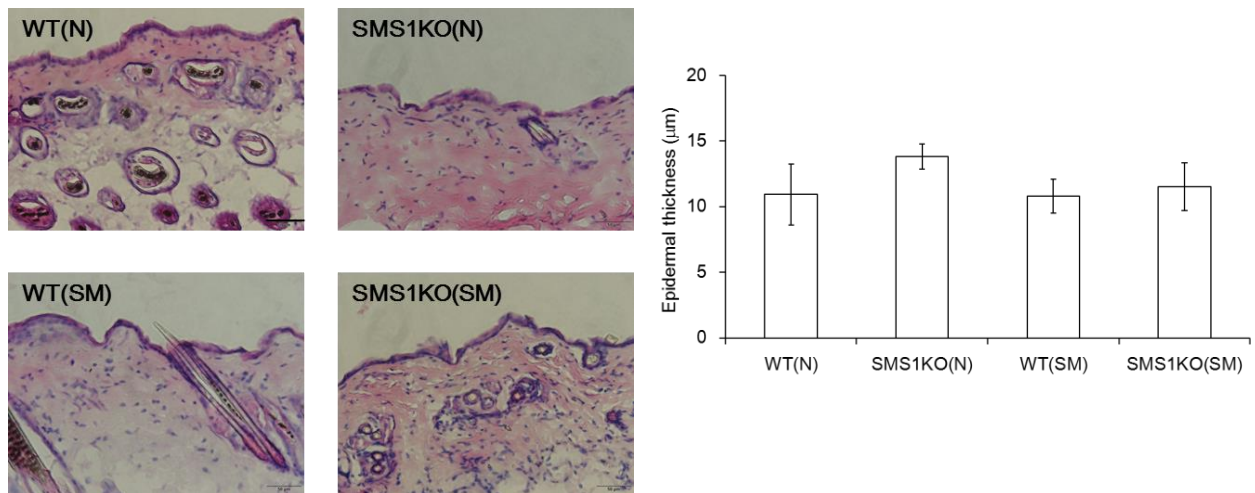


Fig. 21 Changes in skin morphology and epidermal thickness after long-term SM intra-abdominal injection. Skin samples were fixed and stained with hematoxylin and eosin. Bar = 50 μm . Values are the mean \pm S.D. of four experiments.

第4節 考察

本章では SMS1 の皮膚における機能に着目し、TEWL や角層中脂質量の定量を行った。また、SMS1KO マウスに SM を投与した際の影響を調査した。

はじめに、30 週齢前後の SMS1KO マウス皮膚の TEWL を測定した。SMS1KO マウスの TEWL は WT よりも高く、SMS1KO マウス皮膚のバリア機能は、WT マウスと比較して弱い可能性が示された。しかし、SMS1KO マウスの TEWL 値は SMS2KO マウスの TEWL と同程度であり、顕著な増加は認められなかった。SMS2KO マウス皮膚の TEWL は 12 週齢で WT と同程度の値を示したことから、SMS1KO マウスの 30 週齢時点では TEWL に差はあるが、より若齢マウスを用いることで TEWL に大きな差が認められる可能性が考えられる。続いて、SMS1KO マウス角層中のセラミドおよびコレステロール定量を行った。SMS1KO マウス角層中のセラミドおよびコレステロール量は、WT と比較して差はなかった。SMS2KO マウスでは、TEWL の上昇に伴い表皮や角層中のセラミド量は減少していたため、SMS1KO マウスにおいても同様の結果を示すことを予想したが、SMS1KO マウスと SMS2KO マウスでは異なる結果であった。今回用いた SMS1KO マウスは 30 週齢であり、雌雄の区別なく使用したため、今後は異なる週齢での検討や雌雄差を検討する必要がある。

さらに、30 週齢前後の SMS1KO マウスに SM を長期間腹腔内投与し、皮膚に対する SM 投与の影響を検討した。SM 投与後、非投与 WT と投与 WT の TEWL はほぼ同じ値を示した。投与 SMS1KO の TEWL は非投与 SMS1KO よりもわずかではあるが低値を示した。一方、角層セラミドおよびコレステロール量においては、WT も SMS1KO も、非投与と投与群間に差はなかった。同様に、表皮厚においても SM 投与の有無に関わらず WT と SMS1KO 間に差はなかった。

一般的に、SMS を欠損させた細胞や動物における報告では、第 2 章および本章緒論で述べたように、SMS2 欠損と比較して SMS1 欠損は胎生致死や難聴、精子形成不全など、重篤な表現型を示す^{31,32,60,61)} ため、SMS1KO マウスは TEWL の顕著な上昇や角層中のセラミド量の減少が認められると予想した。さらに、そこへ SM を補うことで、皮膚状態が回復することを見込んだが、実際は異なる結果となった。今回検討に用いた SMS1KO マウスは Cre/loxP システムを用いて作製した KO マウスであり、相同組替えを用いて作製した SMS2KO マウスとは KO 方法が異なるため、表現型の反映が異なった可能性がある。しかしながら、SMS1KO マウスへの SM 投与により、わずかながら TEWL の回復が認められた。このことから SMS が欠損していても SM の補充により皮膚バリア機能や皮膚状態が改善することが期待できる。

総括

徳留らはこれまでに、3次元培養ヒト表皮モデルにスフィンゴミエリンリポソームを適用することにより皮膚中のセラミド[NS]、[NP]、[AS]、[AP]が増加すること²⁰⁾、3次元培養ヒト表皮モデルにはスフィンゴミエリナーゼ活性や β -グルコセレブロシダーゼ活性が認められること、などを報告してきた^{21,22)}。一般的にはスフィンゴミエリンからはセラミド[NS]もしくはセラミド[AS]が生成される⁷⁾ことが知られており、スフィンゴミエリンリポソーム適用によりセラミド[NS]、[AS]のみならずセラミド[NP]、[AP]も増加したが、その理由は不明であった。そこで、本研究ではSMに着目し、外的に投与したSMの皮膚中セラミド量の増加に対する機構や、SMそのものの皮膚における役割について検討することとした。

第1章において、スフィンゴミエリンリポソームの適用は皮膚中のセラミド代謝関連酵素であるSPTや α -SMase、 β -GCaseの発現に影響を与え、スフィンゴミエリンやグルコシルセラミドの代謝に関与することで、皮膚中セラミドを増加させる可能性を示した。以上の報告より、本章において、外的に投与したSMが皮膚中のセラミド量の維持に重要な役割を果たすことが示唆された⁶²⁾。

第2章では、SMS2KOマウスを用いて検討したところ、皮膚バリア機能の指標のひとつであるTEWLの上昇とそれに伴う角層中セラミド量の減少が認められ、TEWL、角層セラミド量および表皮厚には週齢によって差があることを示した。以上の報告より、本章において、SMS2KOマウスの皮膚での表現型が明らかとなり、体内に存在するSMが皮膚のバリア機能、恒常性維持に関与していることが示唆された。今後、SMS2KOマウス皮膚での炎症・分化マーカーの発現などを検討することで、体内に存在するSMの皮膚における機能の解明に繋がることが期待できる。

第3章では、SMS1KO マウスを用いて検討したところ、角層中の脂質量や表皮厚は WT と差がなく、一方で TEWL は上昇していることを明らかにした。また、SMS1KO マウスを用いて SM の投与による皮膚状態の変化を検討し、TEWL がわずかながら回復することを示した。しかし、SMS1KO マウスの表現型については週齢差や雌雄差などの課題が残った。

本研究で得られた結果から、外的に投与した SM は表皮中セラミド量を増加させることが示され、その結果から、体内の SM 不足が表皮バリア機能を低下させることを明らかにした。以上より、SM は皮膚バリア機能や恒常性の維持に重要な要因のひとつであることが考えられる。今後、さらに深く SM の機能を調査し、皮膚における SM の重要性がより明らかになることを期待する。

謝辞

本研究に際して、終始御指導、御鞭撻を賜りました城西大学大学院薬学研究科 皮膚生理学講座教授 徳留嘉寛先生ならびに城西大学大学院薬学研究科 薬粧品動態制御学講座教授 杉林堅次先生に心から感謝の意を表します。

的確で親切的な御指導、御助言を賜りました城西大学薬学部 皮膚生理学研究室助手 横田麻美先生に厚く感謝致します。

第2章において SMS2KO マウスの供与と御助言を賜りました麻布大学獣医学部 山下匡教授に感謝致します。

第3章において SMS1KO マウスの供与と御助言を賜りました国立長寿医療研究センター 運動器疾患研究部 渡辺研博士に感謝致します。

第2ならびに3章を通して、SMSKO マウスについての御教示、御助言を賜りました金沢医科大学医学部 岡崎俊郎特任教授、金沢医科大学総合医学研究所 谷口真講師に感謝致します。

本論文作製にあたり、御教示と御校閲を頂きました城西大学大学院薬学研究科 生理学講座教授 加園恵三先生ならびに城西大学大学院薬学研究科 生化学講座教授 荒田洋一郎先生に感謝の意を表します。

研究や研究室での生活を行うにおいて、多大なるご協力を頂きました皮膚生理学講座の皆様に感謝致します。

最後に本論文の作製にあたり犠牲になった動物に深く感謝し、追悼の意を表します。

参考文献

- 1) P.M. Elias, *J. Invest. Dermatol.*, **80**, 44-49 (1983).
- 2) G. Imokawa, M. Hattori, *J. Invest. Dermatol.*, **84**, 282-284 (1985).
- 3) G. Imokawa, H. Kuno, M. Kawai, *J. Invest. Dermatol.*, **96**, 845-851 (1991).
- 4) G. Grubauer, K. R. Feingold, R. M. Harris, P. M. Elias, Lipid content and lipid type as determinants of the epidermal permeability barrier, *J. Lipid Res.*, **30**, 89-96 (1989).
- 5) W.M. Holleran, Y. Takagi, Y. Uchida, *FEBS Letters*, **23**, 5456-5466, (2006).
- 6) Y. Takagi, K. Ernst, G. Imokawa, P.M. Elias, W.M. Holleran, *J. Lipid Res.*, **40**, 861-869 (1999).
- 7) Y. Uchida, M. Hara, H. Nishio, E. Sidransky, S. Inoue, F. Otsuka, A. Suzuki, P. M. Elias, W.M. Holleran, S. Hamanaka, *J. Lipid Res.*, **41**, 2071-2082 (2000).
- 8) S. Hamanaka, M. Hara, H. Nishio, F. Otsuka, A. Suzuki, Y. Uchida, *J. Invest. Dermatol.*, **119**, 416-423 (2002).
- 9) W.M. Holleran, Y. Takagi, G. Imokawa, S. Jackson, J.M Lee, P.M, Elias, *J. Lipid Res.*, **33**, 1201-1209 (1992).
- 10) M. Ponec, A. Weerheim, P. Lankhorst, P. Wertz, *J. Invest. Dermatol.*, **120**, 581-588 (2003).
- 11) Y. Masukawa, H. Narita, E. Shimizu, N. Kondo, Y. Sugai, T. Oba, R. Homma, J. Ishikawa, Y. Takagi, T. Kitahara, Y. Takema, K. Kita, *J. Lipid Res.*, **49**, 1466-1476 (2008).
- 12) J. Hara, K. Higuchi, R Okamoto, M. Kawashima, G. Imokawa, *J. Invest. Dermatol.*, **115**, 406-413 (2000).
- 13) J. Hara, K. Higuchi, R Okamoto, M. Kawashima, G. Imokawa, *Biochem. J.*, **350**, 747-756 (2000).
- 14) M. Ishibashi, J. Arikawa, R. Okamoto, M. Kawashima, Y. Takagi, K.

- Oguchi, G. Imokawa, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **88**, 397-408 (2003).
- 15) R. Okamoto, J. Arikawa, M. Ishibashi, M. Kawashima, Y. Takagi, G. Imokawa, *J. Lipid Res.*, **44**, 93-102 (2003).
- 16) K. Akimoto, N. Yoshikawa, Y. Higaki, M. Kawashima, G. Imokawa, *J. Dermatol.*, **20**, 1-6 (1993).
- 17) K. Jin, Y. Higaki, Y. Takagi, K. Higuchi, Y. Yada, M. Kawashima, G. Imokawa, *Acta Derm. Venereol.*, **74**, 337-340 (1994).
- 18) M. Schmuth, M.Q. Man, F. Weber, W. Gao, K.R. Feingold, P. Fritsch, P.M. Elias, W.M. Holleran, *J. Invest. Dermatol.*, **115**, 459-466 (2000).
- 19) W.M. Holleran, E.I. Ginns, G.K. Grundmann, M. Fartasch, C.E. McKinney, P.M. Elias, E. Sidransky, *J. Clin. Invest.*, **93**, 1756-1764 (1994).
- 20) Y. Tokudome, R. Uchida, T. Yokote, H. Todo, N. Hada, T. Kon, J. Yasuda, H. Hayashi, F. Hashimoto, K. Sugibayashi, *J. Liposome Res.*, **20**, 49-54 (2010).
- 21) Y. Tokudome, M. Endo, F. Hashimoto, *Skin Pharmacol. Physiol.*, **27**, 18-24 (2014).
- 22) Y. Tokudome, M. Jinno, H. Todo, T. Kon, K. Sugibayashi, F. Hashimoto, *Skin Pharmacol. Physiol.*, **24**, 218-223 (2011).
- 23) A.D. Bangham, M.M. Standish, J.C. Watkins, *J. Mol. Biol.*, **13**, 238-252 (1965).
- 24) N. Yoshida, E. Sawada, G. Imokawa, *Arch. Dermatol. Res.*, **304**, 563-577 (2012).
- 25) Y. Haruta-Ono, S. Setoguchi, H.M. Ueno, S. Higurashi, N. Ueda, K. Kato, T. Saito, K. Matsunaga, J. Takata, *J. Dermatol. Sci.*, **68**, 56-62 (2012).
- 26) Obeid L. M., Linardic C. M., Karolak L. A., Hannun Y. A., Programmed cell death induced by ceramide, *Science*, **259**, 1769-1771 (1993).

- 27) Hannun Y. A., Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress, *Science*, **274**, 1855-1859 (1996).
- 28) Huitema K., van den Dikkenberg J., Brouwers J. F., Holthuis J. C., Identification of a family of animal sphingomyelin synthase, *EMBO J.*, **280**, 295-302 (1991).
- 29) Yeang C., Ding T., Chirico W. J., Jiang X. C., Subcellular targeting domains of sphingomyelin synthase 1 and 2, *Nutr. Metab. (Lond.)*, **8**, 89 (2011).
- 30) Vacaru A. M., Tafesse F. G., Ternes P., Kondylis V., Hermansson M., Brouwers J. F., Somerharju P., Rabouille C., Holthuis J. C., Sphingomyelin synthase-related protein SMSr controls ceramide homeostasis in the ER, *J. Cell Biol.*, **185**, 1013-1027 (2009).
- 31) M. Yano, K. watanabe, T. Yamamoto, K. Ikeda, T. Senokuchi, M. Lu., T. Kadomatsu, H. Tsukano, M. Ikawa, M. Okabe, S. Yamaoka, T. Okazaki, H. Umehara, T. Gotoh, J. W. Song, K. Nobe, R. Taguchi, K. Yamagata, Y. Oike, Mitochondrial dysfunction and increased reactive oxygen species impair insulin secretion in sphingomyelin synthase 1-null mice, *J. Biol. Chem.*, **286**, 3992-4002 (2011).
- 32) Z. Li, Y. Fan, J., Liu, Y. Li, C. Huan, H. H. Bui, S. M. Cuo, S. T. Park, G. Cao, C. X. Jiang, Impact of sphingomyelin synthase 1 deficiency on sphingolipid metabolism and atherosclerosis in mice, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **32**, 1577-1584 (2012).
- 33) J. Liu, C. Huan, M. Chakraborty, H. Zhang, D. Lu, S. M. Cuo, G. Cao, C. X. Jiang, Macrophage sphingomyelin synthase 2 deficiency decreases atherosclerosis in mice, *Circ. Res.*, **105**, 295-303 (2009).
- 34) Y. Zhang, J. Dong, X. Zhu, W. Wang, Q. Yang, The effect of

- sphingomyelin synthase 2 (SMS2) deficiency on the expression of drug transporters in mouse brain, *Biochem. Pharmacol.*, **82**, 287-294 (2011).
- 35) S. Mitsutake, K. Zama, H. Yokota, T. Yoshida, M. Tanaka, M. Mitsui, K. Watanabe, Y. Igarashi, Dynamic modification of sphingomyelin in lipid microdomains controls development of obesity, fatty liver, and type 2 diabetes, *J. Biol. Chem.*, **286**, 28544-28555 (2011).
- 36) G. Imokawa, A. Abe, K. Jin, Y. Higaki, M. Kawashima, A. Hidano, Decreased level of ceramides in stratum corneum of atopic dermatitis: An etiologic factor in atopic dry skin?, *J. Invest. Dermatol.*, **96**, 523-526 (1991).
- 37) M. Jung, J. Choi, S. A. Lee, H. Kim, J. Hwang, E. H. Choi, Pyrrolidone carboxylic acid levels or caspase-14 expression in the corneocytes of lesional skin correlates with clinical severity, skin barrier function and lesional inflammation in atopic dermatitis, *J. Dermatol. Sci.*, **76**, 231-239 (2014).
- 38) Y. Sano, K. Masuda, R. Tamagawa-Mineoka, H. Matsunaka, Y. Murakami, R. Yamashita, E. Morita, N. Katoh, Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in the horny layer of patients with atopic dermatitis, *Clinical and Experimental Immunology*, **171**, 330-337 (2012).
- 39) C. Magnonia, E. Euclidia, L. Benassia, G. Bertazzonia, A. Cossarizzab, S. Seidenaria, A. Giannettia, Ultraviolet B radiation induces activation of neutral and acidic sphingomyelinases and ceramide generation in cultured normal human keratinocytes, *Toxicology in Vitro*, **16**, 349-355 (2002).
- 40) Y. Shindo, T. Hashimoto, Ultraviolet B-induced cell death in four cutaneous cell lines exhibiting different enzymatic antioxidant defences: involvement of apoptosis, *J. Dermatol. Sci.*, **17**, 140-150 (1998).

- 41) V. A. Tron, M. J. Trotter, L. Tang, M. Krajewska, J. C. Reed, V. C. Ho, G. Li, p53-Regulated Apoptosis Is Differentiation Dependent in Ultraviolet B-Irradiated Mouse Keratinocytes, *American Journal of Pathology*, **153**, 579-585 (1998).
- 42) T. Hasegawa, H. Shimada, T. Uchiyama, O. Ueda, M. Nakashima, Y. Matsuoka, Dietary glucosylceramide enhances cornified envelope formation via transglutaminase expression and involucrin production, *Lipids*, **46**, 529-535 (2011).
- 43) A. Schwarz, R. Bhardwaj, Y. Aragane, K. Mahnke, H. Riemann, D. Metze, T. A. Luger, T. Schwarz, Ultraviolet-B-Induced Apoptosis of Keratinocytes: Evidence for Partial; Involvement of Tumor Necrosis Factor- α in the Formation of Sunburn Cells, *J. Invest. Dermatol.*, **104**, 922-927 (1995).
- 44) T. S. Kupper, A. O. Chua, P. Flood, J. McGuire, U. Gubler, Interleukin I Gene Expression in Cultured Human Keratinocytes Is Augmented by Ultraviolet Irradiation, *J. Clin. Invest.*, **80**, 430-436 (1987).
- 45) J. W. Lee, H. C. Ryu, Y. C. Ng, C. Kim, J. D. Wei, V. Sabaratnam, J. H. Kim, 12(S)-Hydroxyheptadeca-5Z,8E,10E-trienoic acid suppresses UV-induced IL-6 synthesis in keratinocytes, exerting an anti-inflammatory activity, *Experimental and Molecular Medicine*, **44**, 378-386 (2012).
- 46) J. E. Oh, M. S. Kim, W. K. Jeon, Y. K. Seo, B. C. Kim, J. H. Hahn, C. S. Park, A nuclear factor kappa B-derived inhibitor tripeptide inhibits UVB-induced photoaging process, *J. Dermatol. Sci.*, **76**, 196-205 (2014).
- 47) E. Sawada, N. Yoshida, A. Sugiura, G. Imokawa, Th1 cytokines accentuate but Th2 cytokines attenuate ceramide production in the stratum corneum of human epidermal equivalents: An implication for the disrupted

- barrier mechanism in atopic dermatitis, *J. Dermatol. Sci.*, **68**, 25-35 (2012).
- 48) S. Gowda, C. Yang, S. Wadgaonkar, F. Anjum, N. Grinkina, M. Cutaia, C. X. Jiang, R. Wadgaonkar, Sphingomyelin synthase 2 (SMS2) deficiency attenuates LPS-induced lung injury, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, **300**, 430-440 (2011).
- 49) L. Sun, L. Xu, F. A. Henry, S. Spiegel, T. B. Nielsen, A New Wound Healing Agent-Sphingosylphosphorylcholine, *J. Invest. Dermatol.*, **106**, 232-237 (1996).
- 50) M.J. Zhu, C.D. Kim, Y.B. Kwon, K.C. Kye, Y.Y. Chen, W.H. Lee, S. Lee, J.S. Lim, Y.J. Seo, K. B. Suhr, J.K. Park, J.H. Lee, Induction of connective tissue growth factor expression by sphingosylphosphorylcholine in cultured human skin fibroblasts, *Exp. Dermatol.*, **14**, 509-514 (2005).
- 51) M. Buonanno, M. Stanislauskas, B. Ponnaiya, A. W. Bigelow, G. Randers-Pehrson, Y. Xu, I. Shuryak, L. Smilenov, D. M. Owens, D. J. Brenner, 207-nm UV Light—A Promising Tool for Safe Low-Cost Reduction of Surgical Site Infections. II: In-Vivo Safety Studies, *PLoS ONE*, **11(6)**, 1-12 (2016).
- 52) B. Singh, A. G. Jegga, K. S. Shanmukhappa, R. Edukulla, G. H. Khurana, M. Medvedovic, S. R. Dillon, S. K. Madala, IL-31-Driven Skin Remodeling Involves Epidermal Cell Proliferation and Thickening That Lead to Impaired Skin-Barrier Function, *PLoS ONE*, **11(8)**, 1-15 (2016).
- 53) F. Glatzer, M. Gschwandtner, S. Ehling, K. Rossbach, K. Janik, A. Klos, W. Bäumer, M. Kietzmann, T. Werfe, R. Gutzmer, Histamine induces proliferation in keratinocytes from atopic dermatitis patients, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **132**, 1358-1367 (2013).

- 54) N. Tewari-Singha, S. Inturia, A. K. Jaina, C. Agarwala, D. J. Orlicky, C. W. White, R. Agarwala, B. J. Dayd, Catalytic Antioxidant Aeol 10150 Treatment Ameliorates Sulfur Mustard Analog 2-Chloroethyl Ethyl Sulfide Associated Cutaneous Toxic Effects, *Free Radic. Biol. Med.*, **72**, 285-295 (2014).
- 55) N. Tewari-Singh, A. K. Jain, D. J. Orlicky, C. W. White, R. Agarwal, Cutaneous Injury-Related Structural Changes and Their Progression following Topical Nitrogen Mustard Exposure in Hairless and Haired Mice, *PLoS ONE*, **9**, 1-10 (2014).
- 56) R. Tokumasu, K. Yamaga, Y. Yamazaki, H. Murota, K. Suzuki, A. Tamura, K. Bando, Y. Furuta, I. Katayama, S. Tsukita, Dose-dependent role of claudin-1 in vivo in orchestrating features of atopic dermatitis, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **113**, 4061-4068 (2016).
- 57) Van Duyne G. D., A structural view of cre-loxp site-specific recombination., *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **30**, 87-104 (2001).
- 58) Sauer B., Functional expression of the cre-lox site-specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*., *Mol., Cell, Biol.*, **7**, 2087-2096 (1987).
- 59) Metzger D., Clifford J., Chiba H., Chambon P., Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 6991-6995 (1995).
- 60) M. H. Lu, M. Takemoto, K. Watanabe, H. Luo, M. Nishimura, M. Yano, H. Tomimoto, T. Okazaki, Y. Oike, W. J. Song, Deficiency of sphingomyelin synthase-1 but not sphingomyelin synthase-2 causes hearing impairments in mice, *J. Physiol.*, **590**, 4029-4044 (2012).
- 61) A. Wittmann, M. O. W. Grimm, H. Scherthan, M. Horsch, J. Beckers, H.

- Fuchs, V. Gailus-Durner, M. Hrabě de Angelis, S. J. Ford, N. C. Burton, D. Razansky, D. Trümbach, M. Aichler, A. K. Walch, J. Calzada-Wack, F. Neff, W. Wurst, T. Hartmann, T. Floss, Sphingomyelin Synthase 1 Is Essential for Male Fertility in Mice, *PLoS ONE*, **11(10)**, 1-25 (2016).
- 62) Y. Itaya, Y. Tokudome, Upregulation of gene expression levels of ceramide metabolic enzymes after application of sphingomyelin-based liposomes to a three-dimensional cultured human epidermis model, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **473**, 114-117 (2016).